

Aus den Medizinischen Kliniken, Klinik für Innere Medizin I,
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie und Rheumatologie,
Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Prof. Dr. Michael Pfreundschuh)

**Die Bedeutung von
„Leukocyte Function Associated Antigen-1“
(LFA-1)
bei der Entstehung und im Verlauf der
Graft-versus-Host Erkrankung:
Untersuchung an LFA-1 defizienten Mäusen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2006

vorgelegt von: Claude Thilmany
geb. am: 21. Mai 1975 in Luxemburg (Luxemburg)

1. Tag der Promotion:

2. Dekan:

3. Berichterstatte:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1. Mechanismen der T-Zell-Aktivierung	3
2.2. „Leukocyte Function Associated Antigen-1“ (LFA-1)	6
2.2.1. Aufbau und Funktion von LFA-1	6
2.2.2. Bedeutung von LFA-1 im Rahmen der Leukozytenmigration ..	8
2.2.3. Bedeutung von LFA-1 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung	12
2.3. Knochenmark- und Stammzelltransplantation	14
2.3.1. Geschichte der Knochenmark- und Stammzelltransplantation	14
2.3.2. Formen der Knochenmark- und Stammzelltransplantation	16
2.4. Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD)	18
2.4.1. Pathomechanismus der GvHD	18
2.4.2. Akute GvHD	21
2.4.3. Chronische GvHD	26
2.4.4. Prophylaxe der GvHD	28
2.4.5. Therapie der GvHD	33
2.5. Fragestellung	36
3. Material und Methodik	37
3.1. Mäuse	37
3.2. Durchflusszytometrische Phänotypisierung	38
3.3. Zelltransplantation	42
3.4. Durchflusszytometrische Engraftment Kontrolle	46
3.5. Statistische Analyse	49
4. Ergebnisse	50
4.1. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Spenderzellen:	
Major Histocompatibility (MHC) Inkompatibilität	50
4.1.1. Transplantation von Milzzellen	51

4.1.2. Transplantation von Knochenmarkzellen	54
4.1.3. Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen	57
4.1.4. Syngene Kontrolltransplantation	60
4.2. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Spenderzellen: minor Histocompatibility (miHC) Inkompatibilität Transplantation von Milzzellen	61
4.3. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Empfängerzellen: Major Histocompatibility (MHC) Inkompatibilität Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen	64
5. Diskussion	67
6. Literaturverzeichnis	76
7. Publikationen/Dank	112
8. Lebenslauf.....	114

1. Zusammenfassung

Das „Leukocyte Function Associated Antigen-1“ (LFA-1) ist ein heterodimeres β_2 -Integrin, bestehend aus einer α_L (CD11a)- und einer β_2 (CD18)-Untereinheit. LFA-1 ist sowohl an der Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, als auch an den Interaktionen zwischen Leukozyten untereinander beteiligt. Von besonderem Interesse ist hier die Bedeutung von LFA-1 beim Zusammenspiel von T-Zellen und Antigen-präsentierenden-Zellen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Rolle von LFA-1 im Rahmen einer Graft-versus-Host Erkrankung nach allogener Knochenmark- und/oder Milzzelltransplantation. In einer ersten Versuchsreihe wurden „major histocompatibility“ (MHC) und „minor histocompatibility“ (miHC) Inkompatibilität untersucht, indem Knochenmark- und Milzzellen von CD11a-genmutierten, LFA-1-defizienten und Wildtyp C57BL/6 Mäusen (beide MHC-Genotyp H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c (MHC-Genotyp H-2^d) und BALB.B (MHC-Genotyp H-2^b) Mäuse transplantiert wurden. In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Bedeutung von LFA-1 auf Antigen-präsentierenden-Zellen des Empfängers untersucht. Hierzu wurden Knochenmark- und Milzzellen von BALB/c Mäusen in LFA-1-defiziente und Wildtyp C57BL/6 Mäuse transplantiert. Ein erfolgreiches Engraftment wurde mittels Fluoreszenzdurchflusszytometrie und Nachweis der MHC-Antigene des Spenders bei fehlenden MHC-Antigenen des Empfängers bestätigt.

Sowohl bei der allogenen Transplantation zwischen MHC-inkompatiblen Mäusen (C57BL/6 nach BALB/c und BALB/c nach C57BL/6) als auch zwischen miHC-inkompatiblen Mäusen (C57BL/6 nach BALB.B) bestand kein signifikanter Unterschied in der Überlebenszeit zwischen LFA-1-defizienten und Wildtyp C57BL/6 rekonstituierten Mäusen. Wir schlussfolgern daraus, dass eine alleinige Inhibition von LFA-1 auf Spender oder Empfängerzellen nicht ausreicht eine letal verlaufende Graft-versus-Host Erkrankung zu verhindern.

The role of 'leukocyte function associated antigen-1' (LFA-1) in graft versus host disease: Investigation with LFA-1 deficient mice

The 'Leukocyte Function Associated Antigen-1' (LFA-1) is a β_2 -Integrin, consisting α_L (CD11a) and β_2 (CD18) subunit. LFA-1 is involved in the process of adhesion of leukocytes to endothelial cells and in leukocyte interactions. Of special interest is the role of LFA-1 in the interaction with T-cells and antigen presenting cells. In this study we examined the role of LFA-1 in the context of Graft versus host disease after allogenic bone marrow and/or spleen-cell transplantation. In a first series we examined both Major histocompatibility (MHC) and minor histocompatibility (miHC) mismatch. Bone marrow and spleen cells from LFA-1-deficient and wildtype C57BL/6 mice (both MHC Genotype H-2^b) were transplanted in lethally irradiated BALB/c (MHC Genotype H-2^d) and BALB.B (MHC Genotype H-2^b) mice. In a second series we examined the role of LFA-1 on antigen-presenting cells of the acceptor. Bone marrow and spleen cells were transplanted from BALB/c mice in LFA-1-deficient and wildtype C57BL/6 mice. A successful engraftment was proven by flow cytometry with determination of donor specific MHC antigen in the absence of acceptor specific MHC antigens on peripheral blood leukocytes.

Both in allogenic transplantation between MHC incompatible mice (C57BL/6 to BALB/c and BALB/c to C57BL/6) and between miHC incompatible mice (C57BL/6 to BALB.B) we did not find a significant difference in survival-time between LFA-1-deficient and wildtype C57BL/6 reconstituted mice. We conclude from these facts that the exclusive inhibition of LFA-1 on donor or acceptor cells is not sufficient to prevent lethal graft-versus-disease.

2. Einleitung

2.1. Mechanismen der T-Zell-Aktivierung

Nach dem Eindringen pathogener Erreger in den menschlichen Organismus kommt es zu deren Phagozytose durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Diesem Prozess folgt die Induktion der spezifischen Immunantwort. Antigen-präsentierende-Zellen (APC) nehmen das Antigen auf und migrieren zu den sekundären lymphatischen Organen. Hier wird das Antigen präsentiert (INABA et al., 1984; MCWILLIAM et al., 1994; DE SMEDT et al., 1996; CELLA et al., 1997; BANCHEREAU et al., 1998). Neben den Zytokinen TNF- α , IL-1 und IL-6 sind es die Adhäsionsmoleküle E- und P-Selektin, die Integrine und DC-SIGN, die eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung und Migration der APC einzunehmen (MACPHERSON et al., 1995; ROAKE et al., 1995; PRICE et al., 1997; GEIJTENBEEK et al., 2000; PENDL et al., 2002).

T-Zellen sind die wichtigsten Vertreter des spezifischen Immunsystems. Am besten charakterisiert sind die CD4 positiven T-Helfer-Zellen und die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen (KEENE et al., 1982; AHMED et al., 1988; VON HERRATH et al., 1996; SCHOENBERGER et al., 1998; BENNET et al., 1998). Daneben finden sich auch seltenere Lymphozytenpopulationen, wie $\gamma\delta$ T-Zellen, „Natural Killer“ (NK) Zellen und „Natural Killer“ T (NKT)-Zellen (LANIER et al., 1997; MALOY et al., 1998; MAIER et al., 2001). T-Zellen reagieren nur bei direktem Kontakt mit Antigenen. Naive T-Zellen wandern daher in einem Homing genannten Prozess zu den lymphatischen Geweben (BUTCHER et al., 1996). Bei Kontakt dieser naiven T-Zellen mit dem Antigen kommt es zur Proliferation und Aktivierung von T-Zell Klonen mit bestimmter Antigen-Spezifität. Diese aktivierten Lymphozyten haben Effektorfunktionen und migrieren ins Gewebe, um dort mit Zielzellen zu interagieren.

Die spezifische Antigenpräsentation erfolgt durch den „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) auf den APC. Der T-Zell-Rezeptor (TCR) erkennt Peptid- oder Lipidantigene, die an den MHC gebunden sind (GERMAIN et al., 1999; PORCELLI et al., 1999). Aufgrund der hohen Anzahl verschiedener Antigene hält unser Immunsystem eine riesige Zahl verschiedener T-Zellen mit unterschiedlichen TCR bereit (WAGNER et al., 1998; ARSTILA et al., 1999).

Die Aktivierung naiver T-Zellen, welche zur klonalen Expansion führt, ist ein komplexer, mehrstufiger Prozess. Neben dem Antigen-spezifischen Signal, das durch Interaktion zwischen MHC und T-Zell-Rezeptorkomplex entsteht (Signal 1), sind zur T-Zell-Aktivierung zusätzliche kostimulatorische Signale (Signal 2) nötig (SCHWARTZ et al., 1992). Diese Signale werden unter anderem durch die Interaktion zwischen CD28 auf den T-Zellen und B7 auf den APC vermittelt (KENNEDY et al., 1994; SHINDE et al., 1996; BANCHEREAU et al., 1998). In Abwesenheit einer Kostimulation kommt es zur Apoptose der T-Zelle oder zu ihrer Anergie gegenüber dem Antigen (LAFFERTY et al., 1977; SCHWARTZ et al., 1992; MONDINO et al., 1996; MALISSEN et al., 1999). Vor allem CD28/B7 und LFA-1/ICAM-1 („Intercellular Adhesion Molecule-1“) werden kostimulatorische Funktionen zugesprochen (HARA et al., 1985; VAN SEVENTER et al., 1990; SHAHINIAN et al., 1993; LUCAS et al., 1995; LENSCHOW et al., 1996; SALOMON et al., 1998). Andere potentiell kostimulatorische Moleküle werden ebenfalls diskutiert (VAN SEVENTER et al., 1990; SLIGH et al., 1993; SCHMITS et al., 1996; DEBENEDETTE et al., 1997; YOSHINAGA et al., 1999).

T-Zelle	APC	Funktionen
CD28	B7-1 (CD80)	Kostimulation
CTLA-4	B7-2 (CD86)	Inhibition
ICOS	B7RP	Kostimulation ruhender Memory Zellen
PD-1	PD-L1/PD-L2	Inhibition und anti-apoptotisches Signal
4-1BB (CD137)	4-1BBL	Th1 Differenzierung
CD40	CD40L	B7 Hochregulation Th1 Differenzierung
OX40 (CD134)	OX40L	Th2 Differenzierung
LFA-1	ICAM-1	Adhäsion und Kostimulation
ICAM-1	LFA-1	
ICAM-2,-3	DC-SIGN	Kostimulation
CD2	LFA-3	Adhäsion und Kostimulation
VLA-4	VCAM-1	Adhäsion und Kostimulation

Tabelle 1: Potentiell an der T-Zell-Kostimulation beteiligte Moleküle auf T-Zellen: Liganden auf APC und Funktionen

2.2. „Leukocyte Function Associated Antigen-1“ (LFA-1)

2.2.1. Aufbau und Funktion von LFA-1

Das „Leukocyte Function Associated Antigen-1“ (LFA-1) gehört, wie auch Mac-1 (CD11b/CD18), p150,95 (CD11c/CD18) und CD11d/CD18, zur Familie der β_2 -Integrine. Es ist ein heterodimeres Oberflächen-Glykoprotein, dessen α_L -Untereinheit (CD11a) nicht-kovalent an die β_2 -Untereinheit (CD18) gebunden ist (HYNES, 1987; SPRINGER, 1990). β_2 -Integrine findet man ausschließlich auf Leukozyten (HOGG et al., 2002).

Die Integrine sind gewebspezifisch und spielen nicht in allen Organsystemen eine gleich wichtige Rolle. So scheint das Homing in die Milz unabhängig von Integrinen zu erfolgen, während diese beim Homing in die Lymphknoten nötig sind. Ein Hinweis hierfür ist die bei LFA-1-defizienten Mäusen beobachtete Splenomegalie und fehlende Abstoßung peripherer Tumorzellen bei normaler Immunantwort auf systemische Virusinfekte (SCHMITS et al., 1996).

Integrin	Expressionsort	Liganden
$\alpha_L\beta_2$ (LFA-1, CD11a/CD18)	Alle Leukozyten, insbesondere Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten, hämatopoetische Stammzellen	ICAM-1,-2,-3,-4 und -5
$\alpha_M\beta_2$ (Mac-1, CR3, CD11b/CD18)	Knochenmarkzellen, aktivierte T-Zellen	ICAM-1 und -2, Faktor X, Fibrinogen, C3b _i
$\alpha_X\beta_2$ (CR4, p150.95, CD11c/CD18)	Dendritische Zellen	Fibrinogen, C3b _i
$\alpha_D\beta_2$ (CD11d/CD18)	Monozyten, Makrophagen, Eosinophile	VCAM-1, ICAM-1 und -3

Tabelle 2: Übersicht der β_2 -Integrine: Gewebsverteilung und Liganden

Integrine sind Adhäsionsmoleküle. Sie sind bei der Leukozyten-Endothelzell Adhäsion, Lymphozyten-Rezirkulation, T-Zell-Aktivierung sowie durch „Natural Killer“ (NK) Zellen vermittelten Zytotoxizität involviert (DAVIGNON et al., 1981; SANCHEZ-MADRID et al., 1982; SPRINGER, 1990; SPRINGER 1994;

STARLING et al., 1995). LFA-1 bindet an Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, welche auf Leukozyten, sowie endothelialen und epithelialen Zellen, exprimiert werden (PLOW et al., 2000; HERMAND et al., 2000; TIAN et al., 2000; SPRING et al., 2001). Die I-Domain der α_L -Untereinheit ist, zusammen mit der I-like Domain der β_2 -Untereinheit, entscheidend für die Bindung von LFA-1 an ICAM-1.

Name	Expressionsort
ICAM-1 (CD54)	Fast alle Zellen, insbesondere Lymphozyten und aktivierte Endothelzellen
ICAM-2 (CD102)	Endothelzellen, Lymphozyten und Thrombozyten
ICAM-3 (CD50)	Leukozyten
ICAM-4 (LW blood group glycoprotein)	Erythrozyten
ICAM-5 (Telencephalin)	Nervenzellen im ZNS

Tabelle 3: „Intercellular Adhesion Molecules“: Gewebsverteilung einzelner Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie mit LFA-1 Bindungskapazität

2.2.2. Bedeutung von LFA-1 im Rahmen der Leukozytenmigration

Zur effektiven Immunabwehr müssen die Leukozyten an den Ort des Geschehens gelangen. Die Mechanismen der Migration von Leukozyten in parenchymatöse Organe im Rahmen von Inflammation ist noch schlecht verstanden (WYSOCKI et al., 2005). Besser untersucht ist das Homing naiver T-Zellen aus dem Blut zu den sekundären lymphatischen Organen. Dies geschieht in mehreren Phasen (SPRINGER et al., 1994) und erfolgt vor allem im postkapillären Bett und im venösen Schenkel des Blutkreislaufes (THURSTON et al., 2000).

Nicht aktivierte Leukozyten zirkulieren im Blutstrom und haften nur schwach an andere Zellen. Damit eine stärkere Bindung zustande kommt, sind Adhäsionsmoleküle notwendig. Neben den Integrinen sind auch Selektine, Cadherine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Chemokine an der Leukozytenadhäsion beteiligt (ROSEN et al., 1994; RANSCHT et al., 1994, HOGG et al., 2003).

In einem ersten Schritt werden die Leukozyten reversibel an die Endothelwand gebunden. Hauptmoleküle der Anbindung sind L-, E- und P-Selektin (KANSAS et al., 1996) und ihre Liganden. Das nachfolgende Leukozytenrolling entlang der Gefäßwand ist Voraussetzung für eine feste Adhäsion (LAWRENCE et al., 1991; LINDBOM et al., 1992; VON ANDRIAN et al., 1992). Hierfür verantwortlich sind durch Proteoglykane im Gefäßlumen präsentierte Chemokine, die an ihre jeweiligen Rezeptoren binden und so Signale erzeugen welche die Adhäsion initiieren (CAMPBELL et al., 1998). Während der Phase der Adhäsion und auch der Migration binden Integrine (LFA-1, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_4\beta_7$) an die endothelialen Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie, wie ICAMs, JAMs, VCAM und MAdCAMs (SRIRAMARAO et al., 1994; BERLIN et al., 1995; WAGNER et al., 1996; KIM et al., 1999; CYSTER et al., 1999, HOGG et al.,

2003, EBNET et al., 2004). Im Rahmen der nachfolgenden transendothelialen Migration scheinen Interaktionen zwischen Integrinen und junktionalen Adhäsions Molekülen (JAM), sowie CD31 und CD99 eine Rolle zu spielen (JOHNSON-LEGER et al., 2003).

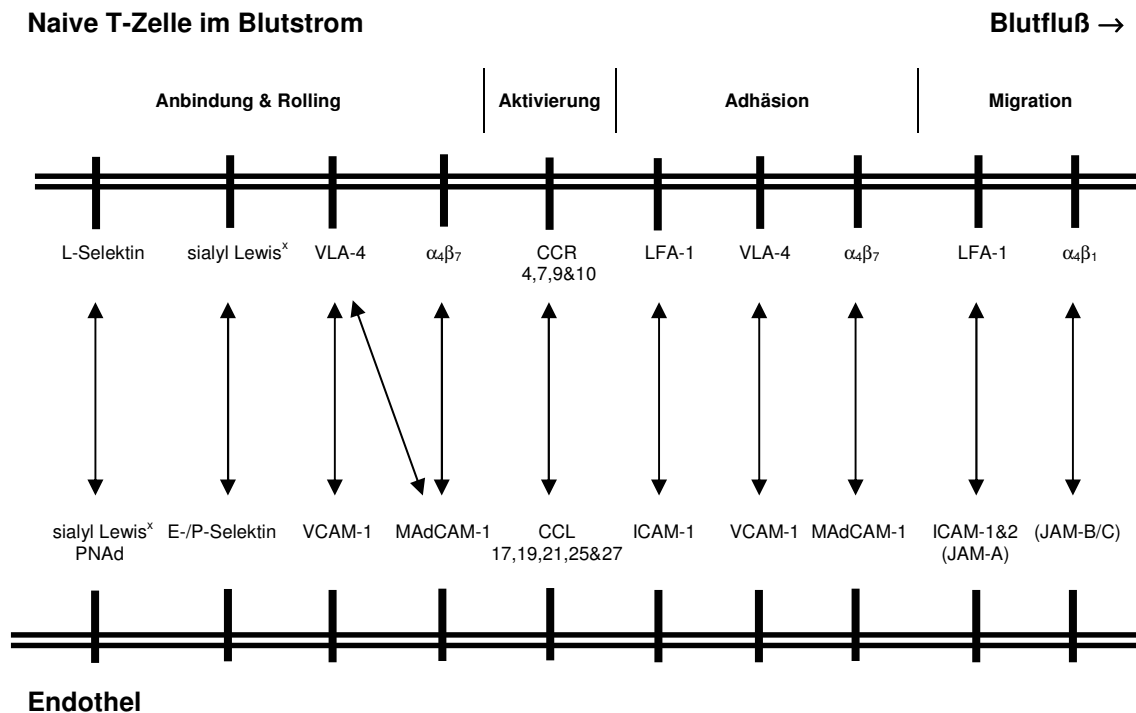


Abbildung 1: Die vier Phasen der Leukozytenadhäsion: Neben den Integrinen sind auch Selektine, Cadherine, Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie und Chemokine an dem komplexen Prozess der Leukozytenadhäsion beteiligt (modifiziert nach HOGG et al., 2003)

Durch die Modulation der Adhäsionsrezeptoren an der T-Zell Oberfläche werden stabile Bindungen der Adhäsionsmoleküle mit ihren Liganden möglich (SPRINGER et al., 1994; CARLOS et al., 1994).

Hauptverantwortliches Integrin für die feste Adhäsion ist LFA-1 (WARNOCK et al., 1998). Kontinuierlich aktiviertes LFA-1 würde zur sofortigen Aggregation der zirkulierenden Zellen und somit zum embolischen Verschluss der Gefäße führen. Im Gegensatz zu den Selektinen, die dauerhaft aktiviert sind, müssen

Integrine daher kurzfristig aktiviert werden (CARMAN et al., 2003; SALAS et al., 2004). Die Aktivierung von LFA-1 bedarf keiner Protein de novo Synthese und geschieht daher rasch (DUSTIN et al., 1989; VAN KOOYK et al., 1989). Sie wird durch, von Endothelzellen präsentierte, Chemokine vermittelt. (SHAMRI et al., 2005). Die Aktivierung von LFA-1 führt, über intrazelluläre Signale („inside-out“ signaling) zu einer Änderung der Avidität von LFA-1 durch Konformitätsveränderung. Diese wiederum wird durch die intrinsische Affinität von LFA-1 und seiner Dichte und Verteilung auf der Zelloberfläche (Valenz / Clustering / Avidität) gesteuert (CONSTANTIN et al., 2000; VAN KOOYK et al., 2000; KATAGIRI et al. 2000; KRAWCZYK et al. 2002; SHIMAOKA et al., 2002); CARMAN et al., 2003; HOGG et al., 2003, SHIMONAKA et al., 2003).

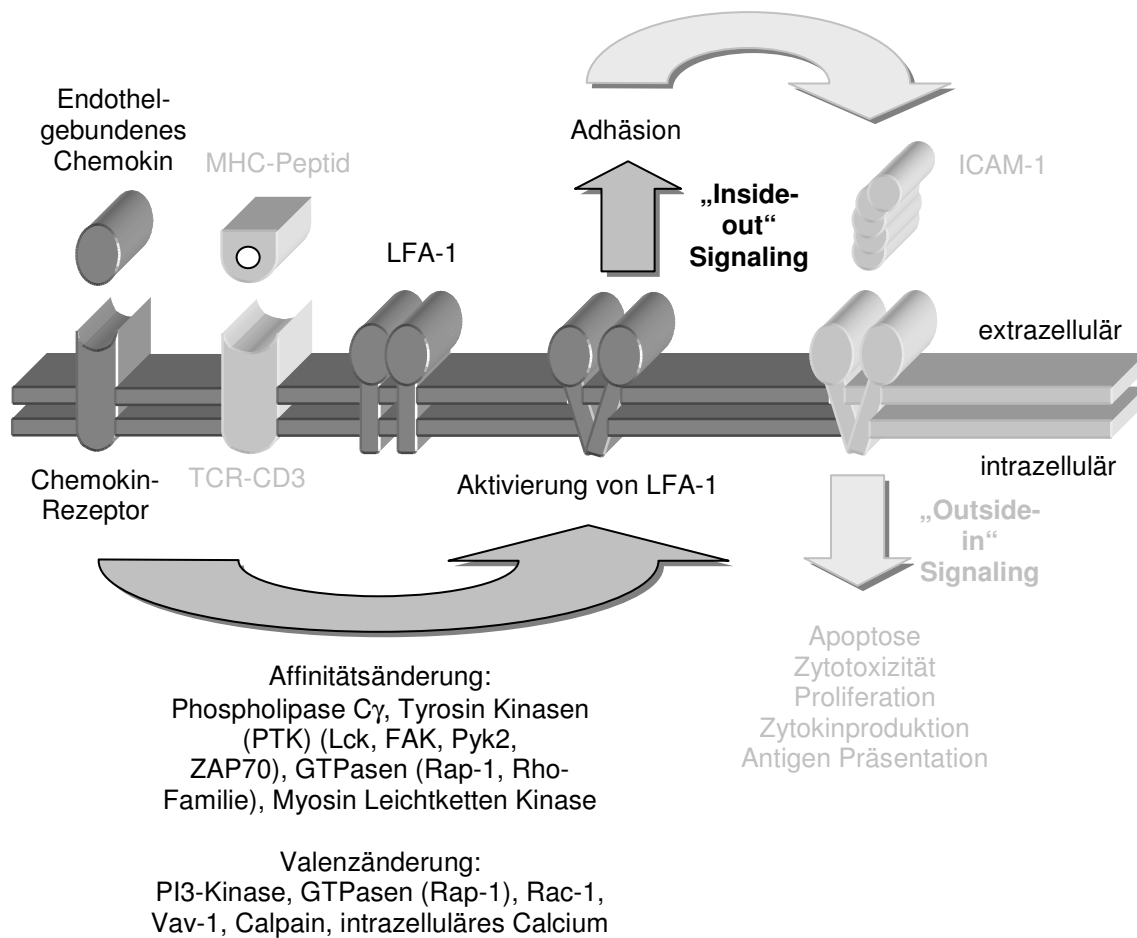


Abbildung 2: „Inside-out“ Signaling der Integrine: Aktivierung von LFA-1 im Rahmen der Leukozytenmigration (modifiziert nach LUB et al., 1995)

2.2.3. Bedeutung von LFA-1 im Rahmen der T-Zell-Aktivierung

Neben der Rolle als Adhäsionsmolekül zur Stabilisierung der T-Zell/APC Bindung (SIMS et al., 2002) hat LFA-1 auch eine kostimulatorische Funktion an der immunologischen Synapse (PRIBILA et al., 2004). Durch die Interaktion zwischen LFA-1 und den ICAMs kommt es zu einer Signalsendung ins Zellinnere und damit zur T-Zell-Stimulation (VAN SEVENTER et al., 1990; SLIGH JR. et al., 1993; LUB et al., 1995; SCHMITS et al., 1996; DEBENEDETTE et al., 1997).

Dieses „Outside-inside Signaling“ durch Integrine könnte Funktionen wie Apoptose, Zytotoxizität, Proliferation, Differenzierung, Antigen-Präsentation und die spezifische Regulation der Transkription von Zielgenen und Zytokinen regulieren (VAN SEVENTER et al., 1990; SPRINGER 1990; VAN SEVENTER et al., 1991; MOY et al., 1992; BINNERTS et al., 1994; KOOPMAN et al., 1994; STARLING et al., 1995). Einen interessanten Ansatz bieten Untersuchungen an normalerweise nicht kostimulatorisch aktiven Zellen. Durch Transfektion mit MHC und ICAM-1 erlangen diese Zellen die Möglichkeit, T-Zellen zu aktivieren (ALTMANN et al., 1989; CAI et al., 1997). Ob es jedoch lediglich zu einer Verstärkung des Signal 1 kommt, oder ob ein echtes kostimulatorisches Signal 2 gesendet wird, war lange umstritten (VAN SEVENTER et al., 1992; ARROYO et al., 1994; NI et al., 1999; ABRAHAM et al., 1999; SHIER et al., 1999; SIRIM et al., 2001), gilt jetzt jedoch als gesichert (HOGG et al., 2003). Die Kostimulation durch LFA-1/ICAM unterscheidet sich jedoch von der durch CD28/B7 (DUBEY et al., 1995; BACHMANN et al., 1997; NI et al., 2001; ABRAHAM et al., 2001).

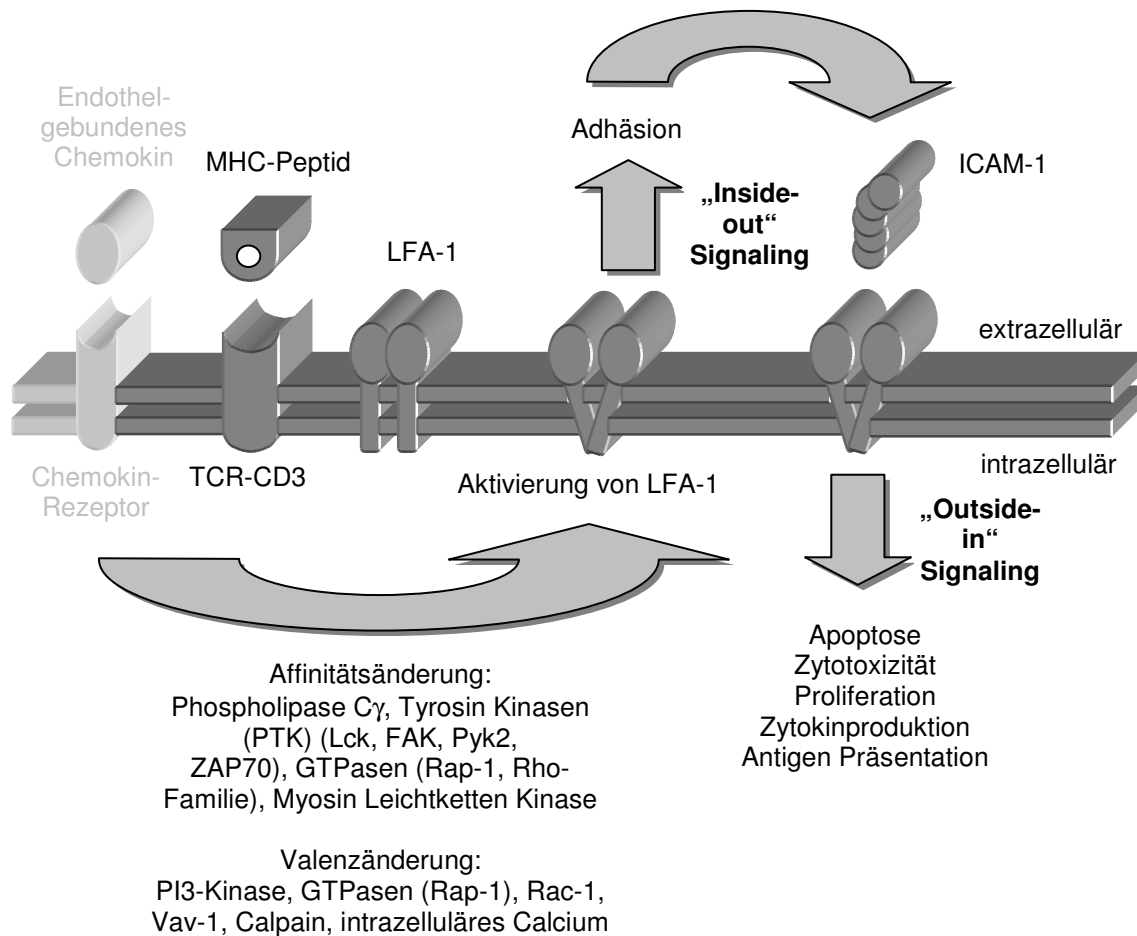


Abbildung 3: „Inside-out“ und „Outside-in“ Signaling der Integrine: Aktivierung von LFA-1 und Bindung an ICAM-1 im Rahmen der T-Zellaktivierung (modifiziert nach LUB et al., 1995)

2.3. Knochenmark- und Stammzelltransplantation

2.3.1. Geschichte der Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Im Jahre 1949 konnte die Arbeitsgruppe um Jacobson zeigen, dass durch Abschirmen der Milz, während der ansonsten letalen Bestrahlung einer Maus, ein Überleben des Tieres ermöglicht wird (JACOBSON et al., 1949). Einige Jahre später berichtete Ford, dass infundierte Knochenmarkzellen eine letal bestrahlte Maus schützen (FORD et al., 1956).

Von Knochenmarktransplantationen am Menschen wird erstmals aus dem Jahre 1957 berichtet (THOMAS et al., 1957). Solche Transplantationen waren jedoch zu diesem Zeitpunkt nur bei eineiigen Zwillingen erfolgreich (THOMAS et al., 1959).

Erste konkrete Transplantationsversuche mit allogenen Knochenmark an Hunden führten zu unterschiedlichsten Ergebnissen: von fehlendem Engraftment und Graft-Abstoßung, über Engraftment mit Graft-versus-Host Erkrankung (Graft-versus-Host Disease, GvHD) bis zu Engraftment ohne GvHD (THOMAS et al., 1962). Am erfolgreichsten waren Knochenmarktransplantationen zwischen Hunden, die sich hinsichtlich ihres Hunde Leukozyten Antigen (Dog Leukocyte Antigen, DLA) nicht unterschieden (EPSTEIN et al., 1969).

Der Grundstock für die moderne Transplantationsmedizin wurde erst durch das Bekanntwerden der Transplantationantigene und des Human Leukocyte Antigen (HLA) Systems gelegt. Diese Erkenntnisse ermöglichten es dem Nobelpreisträger E. D. Thomas, in den späten sechziger Jahren die ersten erfolgreichen allogenen Knochenmarktransplantationen am Mensch durchzuführen. Etwa zehn Jahre später folgten dann erste autologe

Knochenmarktransplantationen mit kryokonserviertem Eigenknochenmark (APPELBAUM et al., 1978).

Die Zahl der weltweit durchgeführten allogenen Knochenmarktransplantationen stieg im weiteren Verlauf rasant an. Durch die Einführung internationaler Datenbanken für Knochenmarkspender wurde es auch möglich für Erkrankte ohne geeigneten Familienspender HLA-identische oder -ähnliche Knochenmarkspender zu identifizieren.

Die Knochenmarktransplantation ist heute eine weit verbreitete und anerkannte Form der Therapie bei einer Vielzahl sowohl benigner als auch maligner Erkrankungen des hämato-onkologischen Formenkreises. So konnte man im Laufe der Jahre Erfahrungen bei aplastischer Anämie (CAMITTA et al., 1979), Thalassämie (THOMAS et al., 1982), Sichelzellanämie (VERMYLEN et al., 1988) und Immundefekten (O'REILLY et al., 1989) sowie bei akuter myeloischer und lymphatischer Leukämie (THOMAS et al., 1977), myelodysplastischem und myeloproliferativem Syndrom (O'DONNELL et al., 1987), insbesondere bei der chronisch myeloischen Leukämie (THOMAS et al., 1986), multiplen Myelom (REIFFERS et al., 1989), Non-Hodgkin Lymphomen (PHILIP et al., 1987), M. Hodgkin (JAGANNATH et al., 1986), Mamma- (PETERS et al., 1988), Hoden- (NICHOLS et al., 1992) und Nieren-Karzinomen (BURK et al., 2001) sammeln.

2.3.2. Formen der Knochenmark- und Stammzelltransplantation

Unter allogener Knochenmark- beziehungsweise Stammzelltransplantation versteht man die intravenöse Infusion von hämatopoetischen Stammzellen eines anderen Individuums. Ziel ist, entweder die Herstellung einer normalen Knochenmarkfunktion bei angeborenen Stoffwechselstörungen, oder die Behandlung maligner Erkrankungen.

Sind Spender und Empfänger genetisch identisch (bei eineiigen Zwillingen), so handelt es sich um eine syngene Transplantation.

Von einer allogenen Knochenmarktransplantation spricht man bei genetisch nicht identischem Spender und Empfänger. Findet man unter den Geschwistern einen HLA-identischen Spender, so ist dieser erste Wahl bei einer allogenen Transplantation. Ist dies nicht der Fall, so muss man auf einen HLA-identischen oder HLA-ähnlichen Fremdspender zurückgreifen. Auch bei dieser Transplantationsform kommt es zu einem dauerhaften Engraftment der Spenderzellen (GINGRICH et al., 1988).

Ist kein HLA-ähnlicher Spender verfügbar, was heute bei weniger als 30 % der Patienten der Fall ist, so kann eine weniger kompatible, haploidentische Person, zum Beispiel Eltern und Kinder, als Spender dienen. Auch hier ist ein dauerhafter Transplantationserfolg möglich (HANSEN et al., 1980). Je größer der HLA-Unterschied, desto höher ist jedoch das Risiko für eine GvHD oder eine Transplantat-Abstoßung (BEATTY et al., 1985).

Einige HLA-Phänotypen sind innerhalb einer bestimmten Bevölkerung häufiger vertreten als andere (BEATTY et al., 1988). Dennoch gestaltet sich die Suche nach einem geeigneten Spender oft schwierig und kann oft nur durch eine internationale, Datenbank gestützte, Suche realisiert werden.

Bei der autologen Transplantation sind Spender und Empfänger in einer Person vereinigt. Als Transplantat dient das eigene Knochenmark oder aus peripherem Blut gewonnene Stammzellen (DICKE et al., 1978). Von entscheidender Bedeutung ist hierbei die Tumorfreiheit des Transplantates. Es besteht ein vernachlässigbares Risiko für eine GvHD, jedoch fehlt auch der wünschenswerte Graft-versus-Leukemia (GvL), respektive Graft-versus-Tumor (GvT) Effekt.

Ende der sechziger Jahre entwickelten E. D. Thomas und R. Storb die Technik zur Knochenmark-Gewinnung, welche auch heute noch in abgewandelter Form zur Anwendung kommt. Durch Aspiration wird Knochenmark aus hinteren und vorderen Anteilen der Os illiacae gewonnen (THOMAS et al. 1970).

Als Alternative zur Knochenmarktransplantation besteht die Möglichkeit, periphere Stammzellen zu transplantieren. Hierbei ist das Sammeln und Konzentrieren von im peripheren Blut zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen nötig (KESSINGER et al., 1988). Um die Zahl der Stammzellen beim Spender zu steigern, werden unterschiedliche Methoden angewendet. Neben der Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren (GIANNI et al., 1989) führt auch eine zyto reduktive Chemotherapie zu einer Steigerung der Produktion von Blutstammzellen und deren Ausschwemmung in der Erholungsphase (TO et al., 1990).

Auch im Nabelschnurblut finden sich hämatopoetische Stammzellen (BROXMEYER et al., 1989). Gluckman konnte 1989 die erste erfolgreiche Stammzelltransplantation mit aus Nabelschnurblut gewonnenen Stammzellen durchführen (GLUCKMAN et al., 1989).

2.4. Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD)

2.4.1. Pathomechanismus der GvHD

Die allogene Knochenmark- oder Stammzelltransplantation soll in der Mehrzahl der Fälle nicht nur das hämatopoetische System des Transplantierten rekonstituieren, sondern auch eine Immunreaktion gegen residuelle Tumorzellen induzieren. Diese, als Graft-versus-Tumor (GvT) oder Graft-versus-Leukemia (GvL) bezeichnete, allogene Immunantwort wird preferentiell durch CD4 positive und CD8 positive T-Zellen vermittelt.

Jedoch werden nach Transplantation nicht nur Tumorzellen, sondern auch körpereigene Zellen des Empfängers als fremd erkannt. Die Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) ist eine typische Komplikation der allogenen Knochenmark-beziehungsweise Blut-Stammzelltransplantation. Es ist eine komplexe Erkrankung die in Inzidenz und Verlauf von vielen Faktoren beeinflusst wird. Bevorzugte Manifestationsorte der GvHD sind die Haut, der Gastrointestinaltrakt, die Lunge und die Leber. Andere Organe, wie zum Beispiel die Nieren, bleiben zumeist verschont (THOMAS et al., 1975).

Das Phänomen einer GvHD wurde bereits 1916 beobachtet (MURPHY, 1916). Man begann jedoch gegen Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts die Pathomechanismen zu verstehen (BILLINGHAM et al., 1959).

Im Jahre 1966 wurden von Billingham drei Bedingungen für die Entstehung einer GvHD formuliert:

1. Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten.

Bereits vor über 35 Jahren erkannte man, dass Lymphozyten für die Entstehung einer GvHD verantwortlich sind (GOWANS, 1962). Heute weiß man, dass pathogenetisch vor allem die T-Zellen eine Rolle spielen. Je mehr T-Zellen das Transplantat enthält, desto schwerer verläuft die GvHD (KERNAN et al., 1986).

2. Das Gewebe des Empfängers muss Alloantigene exprimieren, welche vom Spender nicht exprimiert werden.

Die immunologische Identität eines Individuums wird durch sein Major Histocompatibility Complex (MHC) kodiert. Der MHC des Menschen wird als Human Leukocyte Antigen (HLA) bezeichnet. Das HLA, welches auf den Zelloberflächen aller kernhaltigen Zellen exprimiert wird, ist essentiell für die Aktivierung der T-Zellen und ist damit von entscheidender Bedeutung für das menschliche Immunsystem. Es bildet allerdings auch einen starken Stimulus für allogene T-Zellen (KRENSKY et al., 1990).

Eine GvHD entsteht, wenn transplantierte Spender T-Zellen MHC oder miHC auf Antigen-präsentierenden-Zellen (APC) des Empfängers erkennen. Unterschiede im MHC von Spender und Empfänger sind die bedeutendsten Risikofaktoren bei der Entstehung einer GvHD. Jedoch kann es auch bei alleiniger minor Histocompatibility Complex (miHC) Inkompatibilität zu einer GvHD kommen (MATHE et al., 1979). Eine GvHD wurde auch bei syngenischen Knochenmarktransplantationen beschrieben (HESS et al., 1989).

3. Der Empfänger darf nicht in der Lage sein, die transplantierten Zellen effektiv zu zerstören.

Das nicht beeinträchtigte Immunsystem eines Gesunden würde die T-Zellen eines immunkompetenten Spenders unausweichlich als fremd erkennen und zerstören. In diesem Fall käme auch keine GvHD zustande. Anders ist es jedoch, wenn das Immunsystem des Empfängers geschädigt ist. Diese Situation entsteht zum Beispiel durch eine vor der Transplantation durchgeführte Konditionierung mittels Chemotherapie, Immuntherapie und/oder Bestrahlung.

2.4.2. Akute GvHD

Die akute GvHD ist eine lebensbedrohliche Erkrankung für den Empfänger von Knochenmark oder Blutstammzellen. Sie kann alle Organe befallen, präferentiell aber den Gastrointestinaltrakt, die Leber und die Haut. Infektionen steigern das Risiko einer GvHD-Entwicklung. Die akute GvHD entwickelt sich innerhalb von Tagen, kann aber auch erst Monate nach der Transplantation auftreten. Die Inzidenz ist abhängig vom Grad der Histokompatibilität, der Zahl transplanterter Stammzellen und möglicherweise stattgehabter Infektionen. Art und Dosierung der durchgeführten Prophylaxe beeinflussen die Entstehung der GvHD (PRZEPIORKA et al., 1999).

Die Diagnose bleibt weiterhin eine klinische, obwohl histologische Daten zur Verfügung stehen (SALE, 2005).

Der Schweregrad einer GvHD ist klinisch jedoch oft nur schwierig einzuschätzen, entscheidet jedoch über die Prognose der Erkrankung. Sie wird unterteilt in Grad 0 - IV. Grad 0 entspricht dabei fehlender GvHD. Grad I als milde Ausprägung geht mit lokalen Hautveränderungen einher. Der moderate Grad II ist gekennzeichnet durch generalisierte Hautveränderungen, oder lokale mit Darm- oder Leberbeteiligung. Die Grade I und II sind durch eine nur geringe Morbidität und fast keine Mortalität gekennzeichnet. Grad III entspricht einer schweren GvHD mit Haut-, Darm- und Leberbeteiligung. Grad IV ist lebensbedrohlich. Bei den ausgeprägten Symptomen der Grade III und IV sinkt die Überlebensrate stetig (DEEG et al., 1984).

Pathophysiologisch fasst man die GvHD im Allgemeinen in drei Phasen (zwei afferente, eine efferente) zusammen (DEVETTEN et al., 2004):

1. Konditionierung

Durch die Konditionierung mittels Chemotherapie und/oder Bestrahlung kommt es zu Aktivierung und Schädigung des Empfängerorgans, sowie zur Induktion von inflammatorischen Zytokinen, wie Tumor Nekrose Faktor $\text{TNF-}\alpha$ und Interleukin (IL)-1. Größere Proteine des Empfängers werden durch APC in kleinere Fragmente gespalten. Diese antigenen Peptide binden an Klasse I oder Klasse II HLA-Moleküle und werden an der Oberfläche der APC als Peptid/HLA Komplexe (Alloantigene) präsentiert. Durch die vermehrte Expression von MHC Antigenen kommt es zu einer verstärkten Erkennung von Empfänger MHC und/oder miHC Antigenen durch reife Spender T-Zellen (JAKSCH et al., 2005).

Moleküle wie CD4, CD8, CD44 und Adhäsionsmoleküle modulieren die Interaktionen zwischen Effektor- und Zielzellen, indem sie den zellulären Kontakt und die Signalgebung verstärken (WEISS et al., 1987).

Gleichzeitig kommt es durch die APC zu einer Freisetzung von Zytokinen, vor allem Interleukin-1, welches das Aktivierungssignal für CD4 positive Helfer T-Zellen des Spenders darstellt (RINGDEN 2005).

2. Spender T-Zell Aktivierung

Der Phase der Antigen Präsentation folgt die Aktivierung der T-Zellen. Hierzu ist ein zweites, kostimulatorisches, Signal nötig (JAKSCH et al., 2005). Mehrere kostimulatorische Moleküle, die bei der GvHD eine Rolle spielen, sind mittlerweile bekannt (YU et al., 1998; SAYEGH et al., 1998; DENTON et al.,

1999; SALAMA et al., 2001). Im Rahmen der Aktivierung kommt es zu komplexen, rasch ablaufenden, intrazellulären Vorgängen, welche unter anderem zu einem Anstieg des freien zytoplasmatischen Calciums und zu einer Aktivierung der Protein Kinase C führen (NISHIZUKA et al., 1986; LUB et al., 1995; VAN KOOYK et al., 2000).

Auf die Aktivierung folgt die Phase der klonalen Expansion. Die aktivierten T-Zellen setzen große Mengen an Zytokinen, vor allem IL-2, frei, was zur Aktivierung von CD8-positiven zytotoxischen Zellen und zum Recruitment von Makrophagen und „Natural Killer“ (NK)-Zellen führt (KRENGER et al., 1997; SERODY et al., 1999). Ein Teil der aktivierten CD4-positiven T-Zellen produziert zusätzlich Interferon (IFN)- γ , welches die Expression von Klasse II MHC auf der Zelloberfläche von Epithelzellen und Makrophagen fördert. Dadurch kommt es zu einer weiteren Stimulation der T-Zellen und Aktivierung der NK-Zellen. Möglicherweise spielen auch humorale Immunmechanismen eine Rolle (RINGDEN 2005).

3. Zelluläre und inflammatorische Effektor Phase

Am Ende steht die Effektorphase. Die aktivierten Zellen greifen das Gewebe des Empfängers an und zerstören es durch zytotoxische T-Zellen und NK-Zellen. Hierfür stehen zwei Wege zur Verfügung: Perforin-Granzym vermittelte Zytolyse und FAS-FASL vermittelte Apoptose (LOWIN et al., 1994; VIA et al., 1996). Lipopolysaccharide (LPS), die durch die bei der Konditionierung geschädigte Darmmukosa, lecken stimulieren zusätzlich die Makrophagen, welche IL-1, TNF- α und NO freisetzen (JAKSCH et al., 2005).

Zytokine treiben die immunologischen Reaktionen an, können sie aber auch hemmen. Sie spielen eine herausragende Rolle während aller Phasen der GvHD. Im Allgemeinen geht man davon aus, dass Th1-Zytokine (IL-2, IL-12 und

IFN- γ) die GvHD fördern, während Th2-Zytokine (IL-4 und IL-10) eher einen suppressiven Effekt haben (KRENGER et al., 1997). Allerdings gibt es auch Hinweise für eine protektive Wirkung der Th1-Zytokine (MURPHY et al., 1998).

Daneben spielen verschiedene Chemokine und ihre Rezeptoren (MIP-1 α , MIP-2, Mig, MCP-1, MCP-3, CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR3) eine wesentliche Rolle (MURAI et al., 1999; SERODY et al., 2000; NEW et al., 2002; DUFFNER et al., 2003; JAKSCH et al., 2005).

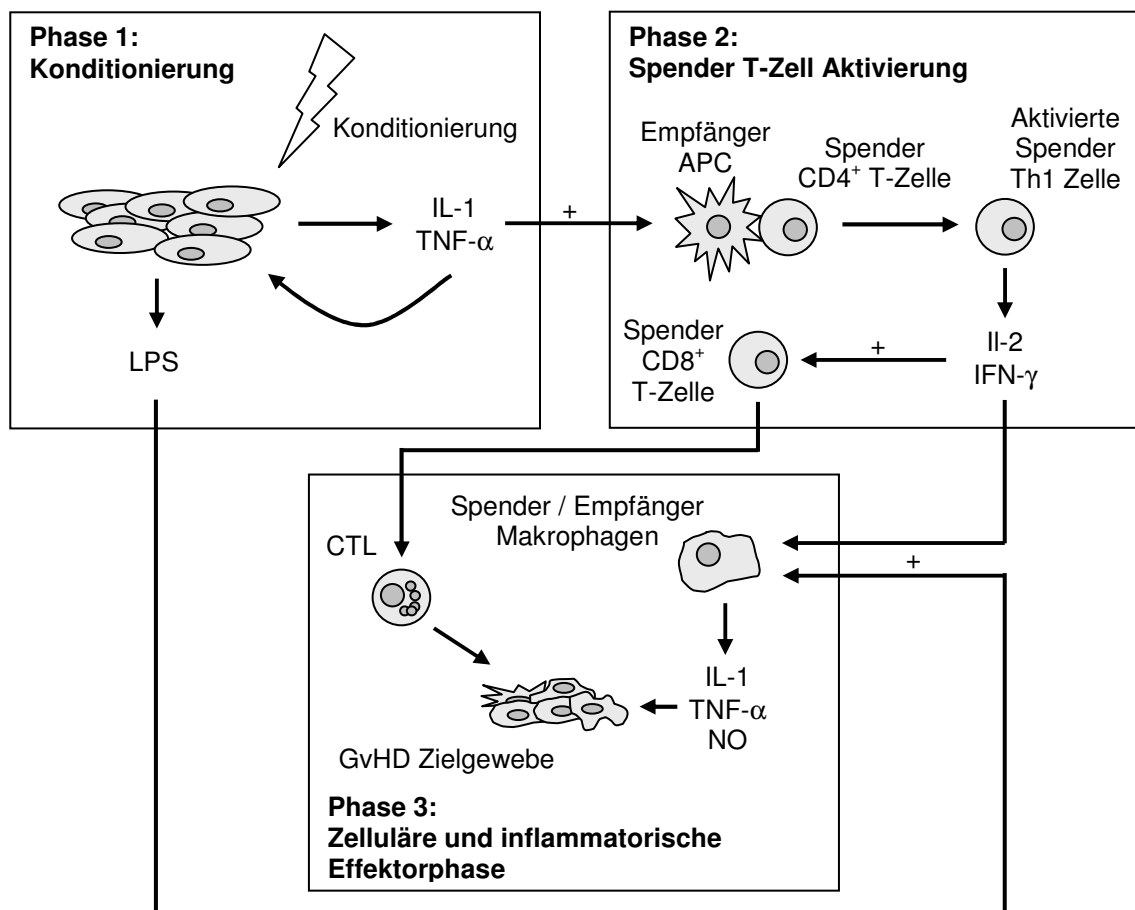


Abbildung 4: Drei-Phasen Modell der akuten GvHD: IL=Interleukin, TNF- α =Tumor Nekrose Faktor- α , LPS=Lipopolysaccharide, APC=Antigen präsentierende Zelle, IFN- γ =Interferon- γ , CTL=Zytotoxische T-Lymphozyten, NO=Stickoxid, GvHD=Graft-versus-Host Disease (modifiziert nach JAKSCH et al., 2005)

Die Migration der Spenderzellen während der GvHD konnte vor kurzem in einem Mausmodell untersucht werden. Innerhalb weniger Stunden nach der Transplantation wandern die Spender T-Zellen in die lymphatischen Gewebe, in denen allogene T-Zellen in den nächsten zwei bis drei Tagen expandieren. Zwischen drei und sieben Tage nach Transplantation steigt die Zahl der alloenen T-Zellen sowohl in den Zielgeweben der GvHD, wie Gastrointestinaltrakt, Leber, Lunge, Haut und Knochenmark, als auch in Geweben die nicht als klassische GvHD Zielorgane angesehen werden, das heißt zentrales Nervensystem, Zahnfleisch und Nasenschleimhaut (PANOSKALTSIS-MORTARI et al., 2004).

Klinisch manifestiert sich die akute GvHD meist zuerst an der Haut in Form eines juckenden makulo-papulösen Exanthems. Prädilektionsstellen sind die Handflächen, die Fußsohlen und die Ohren. Oft folgt eine Erythrodermie des ganzen Körpers mit Blasenbildung und Schuppung. Es kommt zu einer schweren, manchmal irreversiblen, Schädigung der Epidermis und der Haarfollikel. Häufig kommt es zu gastrointestinalen Symptomen mit Übelkeit, blutigem Durchfall, Bauchschmerzen und paralytischem Ileus. Auch eine Störung der Leberfunktion mit Hyperbilirubinämie, erhöhten Transaminasen und alkalischer Phosphatase im Serum, pathologischen Gerinnungswerten und Ausbildung einer Enzephalopathie ist möglich. In schweren Fällen kann es zum Leberausfallskoma kommen.

2.4.3. Chronische GvHD

Die chronische GvHD ist gekennzeichnet durch eine, trotz moderner Therapieansätze, körperweite Organschädigung und eine hohe Morbidität. Ursprünglich wurde die chronische GvHD als eine über den hundertsten Tag nach Knochenmarkstransplantation hinaus bestehende GvHD definiert. Zwischen Fortführung einer akuten GvHD, nach einem krankheitsfreien Intervall, und de novo Entstehung wurde nicht unterschieden (SULLIVAN et al., 1981). Die für die chronische GvHD typischen Veränderungen können jedoch bereits vierzig bis fünfzig Tage nach der Transplantation auftreten. Die jeweiligen Zeitrahmen für die akute und die chronische Form der GvHD überlappen sich also. Dies macht eine Einteilung nach klinischen, histologischen und immunologischen Kriterien sinnvoller als nach der willkürlich gewählten Hundert-Tage-Grenze.

Die akute GvHD ist ein wichtiger Prediktor für die Entstehung der chronischen Form. 70-80% der Patienten mit akuter Grad II-IV GvHD entwickeln eine chronische GvHD (OCHS et al., 1996). Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmodelle: Die chronische GvHD ist die späte Erscheinungsform der alloreaktiven akuten GvHD, Folge von Gewebszerstörung durch die akute GvHD, Folge der Behandlung der akuten GvHD oder ein Epiphenomen, welches nicht ätiologisch mit der GvHD zusammenhängt (WAGNER et al., 1998; WEINBERG et al., 2001; LEE, 2005).

Der Übergang aus der akuten Form der Erkrankung, lichenoiden Hautveränderungen sowie erhöhte Serum-Bilirubinwerte gelten als prognostisch ungünstig (WINGARD et al., 1989). Ein Großteil aller Patienten zeigt papulo-squamöse Hautveränderungen ähnlich dem Lichen planus. Es finden sich Plaques, Schuppung, Depigmentation und Vitiligo. Die Zerstörung der Hautanhangsgebilde führt zu Alopezie und Nagelanomalien. Die schwere

chronische GvHD ähnelt dem Bild einer Sklerodermie. Gehäuft findet sich eine cholestatische Lebererkrankung, welche in einer Leberzirrhose gipfeln kann. Die schwere Mukositis des Mundes und der Speiseröhre führt nicht selten zu Strikturen, Malabsorption und Gewichtsverlust. Häufig findet man auch ein Sicca-Syndrom mit Atrophie und Trockenheit der Mucosa der Augen, des Mundes, der Atemwege und der Speiseröhre. Zusätzlich findet man pulmonale Insuffizienz, Bronchiolitis obliterans, Myositis und Neuropathien. Das Immunsystem ist fast immer mit betroffen, so dass die Patienten sehr anfällig für opportunistische Infektionen durch Bakterien, Viren und Pilze sind (RINGDEN, 2005).

Auf der anderen Seite ist gerade bei der chronischen GvHD der GvL-Effekt am ausgeprägtesten (WEIDEN et al., 1981).

2.4.4. Prophylaxe der GvHD

Eine ideale Prophylaxe erfüllt zwei wichtige Voraussetzungen:

1. Selektive Anergie oder Toleranz der T-Zellen des Spenders gegenüber dem Empfänger nach Transplantation immunkompetenter Knochenmark- oder peripherer Blutstammzellen
2. Vermittlung von Graft-versus-Tumor oder Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekten durch die T-Zellen des Spenders

Man geht davon aus, dass die Schädigung des Spendergewebes durch die Konditionierung mit für die Entsehung der GvHD verantwortlich ist. Hierfür spricht, dass eine nicht myeloablative Konditionierung zu einer Reduktion in der Inzidenz der GvHD führt (COURIEL et al., 2004).

Die am häufigsten prophylaktisch angewendeten Maßnahmen sind jedoch die Anwendung pharmakologischer Substanzen sowie die ex vivo T-Zell Depletion der Spenderzellen (BRUNNER et al., 2003).

Die Behandlung mit Cyclosporin A (CsA) und Methotrexat ist die derzeit wirkungsvollste medikamentöse Prophylaxe (RINGDEN et al., 1992). Eine zusätzliche prophylaktische Gabe von Glucocorticoiden scheint keinen prognostischen Vorteil zu bieten (CHAO et al., 1999). Ergänzend werden antiproliferative Substanzen wie Tacrolimus, Azathioprin, Mycophenolat Mofetil (MMF) oder Rapamycin (Sirolimus), die die klonale Expansion der aktivierten T-Zellen verhindern, mehr oder weniger erfolgreich eingesetzt (JOLIVET et al., 1983; MEISER et al., 1991; MORRIS et al., 1991; WATSON et al., 1999; KAHAN et al., 1999; MCALISTER et al., 2000; NASH et al., 2000; KIEHL et al., 2002; MCSWEENEY et al., 2003; NASH et al., 2003). Die Kombinationen

mehrerer Substanzen zeigt möglicherweise einen besseren Wirkungsgrad als die Therapie mit einer einzigen Substanz allein, steigert jedoch auch die Gesamtoxizität. Der Langzeiteffekt ist zum Teil nur unzureichend klinisch untersucht.

Neben der klassischen in-vitro T-Zell Depletion (MITSUYASU et al., 1986; DE WITTE et al., 1986) stehen heute auch die ex-vivo Selektion CD34 positiver Veto-Zellen (RACHAMIN et al., 1998; AVERSA et al., 2002) sowie die gezielte Nutzung einer Inkompatibilität zwischen inhibitorischen NK-Zell Rezeptoren und Spender NK-Zellen (RUGGERI et al., 1999; RUGGERI et al., 2002). Eventuell sind bei letztgenannten Verfahren unerwünschte Nebenwirkung, wie EBV-induzierte lymphoproliferative Erkrankungen und fehlende GvL, weniger ausgeprägt (DEVETTEN et al., 2004).

Zur in-vivo T-Zell Depletion wurde bisher am häufigsten das polyklonale Antithymozyten Globulin (ATG) angewandt (REMBERGER et al., 2002; DUGGAN et al., 2002; MEIJER et al., 2003).

Die prophylaktische Anwendung monoklonaler Antikörper scheint eine vielversprechende Option hierzu zu sein (HOWS et al., 1993; CHAKRABATI et al., 2003). Einen neuen Ansatz in dieser Richtung bietet der Einsatz von monoklonalen Campath-1H Antikörpern (Alemtzumab) gegen CD52 (HALE et al., 1998; PEREZ-SIMON et al., 2002). Dieser Antikörper scheint zusätzlich Spender-APC zu depletieren (BUGGINS et al., 2002). Dies ist interessant, da auch die Inaktivierung von Empfänger APC zu einer GvHD-Prävention beitragen kann (SHLOMCHIK et al., 1999).

Weitere Wege Empfänger APC auszuschalten bestehen in der extrakorporalen Photophorese (MILLER et al., 2004) und der Blockierung kostimulatorischer Signale (GRIBBEN et al., 1996; GUINAN et al., 1999). Gut untersucht ist hier

vor allem der CD28/B7 Komplex (SCHWARTZ et al., 1992; LENSCHOW et al., 1992; BLUESTONE et al., 1996). Ein Großteil der Untersuchungen zu dieser Einheit wurde anhand monoklonaler Antikörper durchgeführt. Mäuse, welche Spenderzellen von CD28 Knockout Mäusen erhielten, entwickelten, trotz Proteindefizienz und verminderter ex vivo Proliferation in Gegenwart von allophenen Zellen in der „mixed lymphocyte reaction“ (MLR), eine GvHD (SHAHINIAN et al., 1993; BLAZAR et al., 1999; MAIER et al., 2001). Die systemische in vivo Blockierung der CD28/B7 Interaktionen führte zu einer Verminderung der GvL Reaktion (KAWAI et al., 1996; BLAZAR et al., 1997; SPEISER et al., 1997).

Zum Anwendungsspektrum der monoklonalen Antikörper gehört auch die Blockierung kostimulatorischer Signale (MURPHY et al., 1999; OGAWA et al., 2001) durch Infusion von CTLA-4-Ig (GUINAN et al., 1999) oder monoklonale anti-CD40L (CD154) Antikörper (BLAZAR et al., 1997; SEUNG et al., 2000).

Eine weitere oft angewandte prophylaktische Maßnahme ist die in vitro T-Zellen-Depletierung des Spenderknochenmarks durch anti-CD2, anti-CD3, anti-CD5 und anti-CD8 (FILIPPOVITCH AH, 1982; MITSUYASU RT et al., 1986; ANTIN JH et al., 1991). Diese führt zwar zu einer Verminderung der Inzidenz der GvHD aber auch zu einer erhöhten Rate an Graftverlusten und zu einer erhöhten Rezidivrate maligner Grunderkrankungen durch Fehlen einer GvT/GvL Reaktion (HOROWITZ et al., 1990). Durch die verzögerte, fraktionierte Gabe der T-Zellen des Spenders nach Konditionierung und Transplantation von T-Zell depletiertem Knochenmark versucht man eine Abschwächung der GvHD zu erreichen, ohne dabei auf eine GvT/GvL Reaktion verzichten zu müssen (BARRETT et al., 1997). Neuere Daten zeigen für dieses Verfahren eine verzögerte GvHD bei allerdings weiterhin beträchtlicher Morbidität und Mortalität.

Ein weiterer Ansatz liegt in der Blockierung inflammatorischer Zytokine mittels IL-1 Rezeptor Antagonisten (MCCARTHY et al., 1991), monoklonaler anti-TNF- α Antikörpern, wie Infliximab oder Adalimumab, löslicher TNF Rezeptoren, wie Etanercept (HOLLER et al., 1995), sowie IL-2 Rezeptor Antagonisten (BLAISE et al., 1991; ANASETTI et al., 1991).

IL-18 ist ein erst vor einigen Jahren entdecktes Zytokin, welches bei der akuten GvHD erhöht ist. Erstaunlicherweise führte die Blockade dieses Interleukins im Tierversuch allerdings zu einer Steigerung der GvHD bedingten Mortalität (REDDY et al., 2001). Die Gabe von IL-18 an Stammzellspender vor der Transplantation scheint hingegen einen protektiven Effekt zu haben (JAKSCH et al., 2005). Die Gabe von IL-18 erhöhte die Überlebensrate bei der CD4⁺-vermittelten GvHD, erniedrigte sie jedoch bei der CD8⁺-vermittelten Form (MIN et al., 2004).

Bei Mäusen konnte ferner gezeigt werden, dass CD4⁺/CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg) wichtige Regulatoren der GvHD sind, die Expansion alloreaktiver T-Zellen supprimieren, und damit eine letale GvHD verhindern können (TAYLOR et al., 2002). Der Stellenwert beim Menschen ist noch unklar; die positiven Effekte scheinen sich aber auch hier zu bestätigen (MARTIN et al., 2004; STANZANI et al., 2004, BLAZAR et al., 2005).

Keratinocyten Wachstumsfaktor (Keratinocyte Growth Factor, KGF) scheint ebenfalls eine protektive Wirkung zu zeigen (PANOSKALTSIS-MORTARI et al., 1998).

Einen weiteren Ansatz bietet die Blockade des MHC durch Verhinderung der Bindung an den T-Zell-Rezeptor (SCHLEGEL et al., 1996).

Auch die Infusion von Spender NK-Zellen klingt vielversprechend. Im Mausmodell führt sie zu einer Reduktion der GvHD. Erfahrungen beim Menschen fehlen. Hierzu werden derzeit klinische Studien durchgeführt (RUGGERI et al., 2002).

Desweiteren stehen bei Mäusen Substanzen zur Antagonisierung von Lypopolysacchariden (LPS) (COOKE et al., 2001) und speziellen Zytokine (IL-2, IL-11 und IL-12) zur Bevorzugung der Th2 Antwort (WANG MG et al., 1999; HILL et al., 1998; SYKES et al., 1995) zur Verfügung.

Zur Prophylaxe der chronischen GvHD konnte an einem kleinen Kollektiv ein positiver Effekt durch extrakorporale Photoporese erreicht werden (CHAN et al., 2003). Bisher konnte für andere Therapien keine präventive Wirkung gezeigt werden (LEE, 2005).

2.4.5. Therapie der GvHD

Die Basistherapie der akuten GvHD besteht in der Behandlung mit Corticosteroiden. Die zusätzliche Gabe von monoklonalen anti-CD5 Antikörpern (CAHN et al., 1995) oder anti-CD5 Immunotoxin (MARTIN et al., 1996) scheint keine prognostischen Vorteil zu bringen.

Bei steroid-resistenter akuter GvHD gibt es derzeit keine allgemeingültigen Standards zum weiteren Vorgehen. Bisher wurde am häufigsten ATG mit wechselndem Erfolg eingesetzt (ARAI et al., 2002; MACMILLAN et al., 2002).

Anderere therapeutische Ansätze sind die Gabe von Pentostatin (BOLANOS-MEADE et al., 2002), Rapamycin (BENITO et al., 2001), sowie IL-1 Rezeptor Antagonisten (ANTIN et al., 1994; MCCARTHY et al., 1996).

Zu den monoklonalen Antikörpern gehören monoklonale anti-TNF- α Antikörper (Infliximab) (COURIEL et al., 2004) und lösliche TNF Rezeptoren Etanercept (ANDOLINA et al., 2000; UBERTI et al., 2003).

Zusätzlich untersucht werden IL-2, anti-CD3 und anti-CD7 Immunotoxine (HO et al., 2002; VAN OOSTERHOUT et al., 2000), sowie cA2, ein weiterer anti-TNF α Antikörper (URRA et al., 2001).

Eine andere Möglichkeit die GvHD zu kontrollieren sieht man in der in vivo Depletion der T-Zellen nach der Effektorphase. Erreicht wird dies durch Implementierung von Suizid-Vektoren in die T-Zellen des Spenders und Ganciclovir Gabe bei Ausbruch der Erkrankung (BONINI et al., 1997). Diese Methode ist jedoch sehr aufwendig und wenig praktikabel.

Weitere therapeutischen Optionen bieten die Verwendung von monoklonalen Antikörper gegen IL-2 Rezeptor Untereinheiten (HERVE et al., 1990), sowie anti-FasL Antikörper (MIWA et al., 1999). Monoklonale anti-FasL vermindern signifikant die Ausprägung einer GvHD im Mausmodell (HATTORI et al., 1998). Hierzu steht bei Menschen Daclizumab zur Verfügung (PRZEPIORKA et al., 2000). Eine neuer Studie zeigte hier allerdings eine schlechtere 100-Tage Überlebensrate, die zum Abbruch der Studie führte (LEE et al., 2004).

Ebenfalls möglich ist das Ausschalten von Adhäsionsmolekülen durch monoklonale anti-LFA-1 Antikörper (STOPPA et al., 1991). Diese konnten in mehreren Untersuchungen eine GvHD verhindern oder zumindest abschwächen (HARNING et al., 1991). Untersuchungen zur Transplantation solider Organe legen nahe, dass die beobachteten Effekte, auf die fehlende oder verzögerte Adhäsion der alloreaktiven Lymphozyten zurückzuführen ist. Ein entsprechender humaner Antikörper steht mit Efalizumab zur Verfügung (CRAIG, 2003). Weiter sind der monoklonale anti-CD3 Antikörper Visilizumab und der monoklonale anti-CD147 Antikörper ABX-CBL mit Wirkung gegen aktivierte T-Zellen verfügbar (DEEG et al., 2001; CARPENTER et al., 2002). Letztgenannte Substanzen konnten ihre Wirkung bei der Behandlung der akuten Steroid-resistenten GvHD bereits unter Beweis stellen (BRUNER et al., 2003). Auch ein monoklonaler anti-CD2 Antikörper steht zur Verfügung (PRZEPIORKA et al., 1998).

Ein weiteres Verfahren zur Therapie der akuten GvHD stellt die extrakorporale Photophorese dar (GREINIX et al., 2000; DALL'AMICO et al., 2002).

Ein Fallbericht zeigte positive Effekte durch Infusion mütterlicher mesenchymaler Stammzellen (LE BLANC et al., 2004).

Zur Behandlung der chronischen GvHD stehen im wesentlichen ähnliche Verfahren zur Verfügung, wie sie zur Prävention und Behandlung der akuten Form eingesetzt werden. Im Einzelnen sind das Steroide (SULLIVAN et al., 1981), Pentostatin (JACOBSON et al., 2001; GOLDBERG et al., 2003), Hydroxychloroquin (LEE, 2005), Mycophenolat Mofetil (WOOD et al., 2003), Rapamycin (Sirolimus) (JOHNSTON et al., 2005), Daclizumab (WILLENBACHER et al., 2001), Alemtuzumab (LEE, 2005), Etanercept (CHIANG et al., 2002), Rituximab, ein chimärer murin-humaner CD20 Antikörper (RATANATHARATHORN et al., 2003; CANNINGA-VAN DIJK et al., 2004), sowie die Empfänger-Depletion mit Treg-Zellen (ANDERSON et al., 2004). Viele Verfahren werden zur Zeit erst untersucht, und ihre Wirksamkeit ist noch unklar.

2.5. Fragestellung

Zahlreiche Untersuchungen zur Bedeutung von LFA-1 für die in vivo Modulation der Immunantwort liegen vor. Verwendet wurden in den meisten Fällen gegen LFA-1 gerichtete monoklonale Antikörper. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind divergent, zum Teil sogar widersprüchlich. Zusätzlich bergen die verwendeten Antikörper die Gefahr, Zellen unspezifisch zu aktivieren oder zu depletieren.

Die Verwendung von Knockout Mäusen ermöglicht uns, gezielt die in vivo Funktion von LFA-1 und die Auswirkungen seines Fehlens zu untersuchen. Mögliche Störeinflüsse, wie sie bei der Gabe von monoklonalen Antikörpern auftreten können, werden so weitgehend vermieden. Als Modell wurde die Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) im Rahmen einer Knochenmark-/Stammzelltransplantation gewählt. Untersucht werden soll die Entwicklung einer GvHD bei LFA-1-defizienten/CD11a-genmutierten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen im Hinblick auf eine mögliche kostimulatorische Funktion von LFA-1. Folgende Punkte wurden im einzelnen überprüft:

1. Bedeutung von LFA-1 auf Spenderzellen des Knochenmarks mit wenig T-Zellen.
2. Bedeutung von LFA-1 auf Spenderzellen der Milz mit sehr hohem T-Zell-Anteil.
3. Bedeutung von LFA-1 auf Spenderzellen bei MHC-identischen, miHC-divergenten Empfängertiere.
4. Bedeutung von LFA-1 auf Empfängerzellen bei MHC-divergenter Transplantation von Milzzellen.

3. Material und Methodik

3.1. Mäuse

Die verwendeten CD11a-genmutierten/LFA-1-defizienten und Wildtyp C57BL/6 (beide MHC-Genotyp H-2^b) Mäuse stammten aus der eigenen Nachzucht, der von Rudolf Schmits etablierten CD11a-genmutierten Mauslinie (SCHMITS et al., 1996). Die CD11a-genmutierten Mäuse wurden aus der ES-Zelllinie E14K aus 129J-Mäusen (H-2^b) erstellt. Bei Übernahme der Mauslinien waren die CD11a-genmutierten Mäuse 6-8 mal in C57BL/6 (H-2^b) zurückgekreuzt. CD11a homozygot-genmutierte Mäuse zeigen keine CD11a Expression. Die CD18 Expression ist auf das für die anderen β_2 -Integrine zu erwartende Niveau vermindert. Die Expression von Mac-1 ist nicht beeinträchtigt. LFA-1-defiziente Mäuse sind lebensfähig, fertil, entwickeln sich normal und sind nicht besonders anfällig gegenüber Infektionskrankheiten. Als Hinweis auf einen Lymphozyten Homing Defekt weisen LFA-1-defiziente Mäuse jedoch nur sehr kleine periphere Lymphknoten und eine Splenomegalie auf (SCHMITS et al., 1996)

Die BALB/c (MHC-Genotyp H-2^d) und BALB.B (MHC-Genotyp H-2^b) Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln mindestens eine Woche vor der Transplantation bezogen.

Die für die Transplantation benötigten Tiere aus der normalen Tierhaltung wurden eine Woche vor dem geplanten Transplantationstermin aussortiert und in autoklavierten Käfigen mit sterilem Streu, Futter und Trinkwasser gehalten. Dem Trinkwasser wurde Ciprobay[®] (Ciprofloxacin, Bayer, Leverkusen) in einer Dosierung von 0,1 mg/ml zugesetzt.

3.2. Durchflusszytometrische Phäotypisierung

Eine der Schwanzvenen wurde mit Hilfe einer Skalpellklinge angeschnitten und 20 µl Blut in eine heparinisierte Glaskapillare aufgenommen. Für die phäotypische Charakterisierung der Mäuse wurde das Schwanzvenenblut nach Antikörperfärbung durchflusszytometrisch untersucht.

Hierzu wurde das Blut in einem 5 ml FACS-Röhrchen mit 100 µl FACS Puffer vermischt. Zur Herstellung des FACS Puffers wurden 500 ml PBS, Calcium und Magnesium frei, mit:

- 20 ml einer 0,5-molaren EDTA-Lösung, pH 8,0 (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- 5 ml einer 1,5-molaren NaN_3 -Lösung (Merck, Darmstadt)
- 5 g Rinderalbumin (Merck, Darmstadt)

versetzt.

Das verdünnte periphere Blut wurde nachfolgend mit 4 µl der anti-CD11a Antikörperlösung inkubiert. Verwendet wurden monoklonale Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugierte Ratten anti-Maus CD11a (Integrin α_L Kette, LFA-1 α Kette) Antikörper (PharMingen, San Diego, CA, USA):

- Katalognummer: 01844D, 0.5 mg
- Klon: M17/4
- immunogen: sekundär zytotoxische T-Zellen aus der Milz von C57BL/6 Mäusen
- Isotyp: Ratte (Wistar/Furth) IgG_{2a,k}
- Inhalt: FITC-konjugiertes Immunglobulin in 50 mM Tris-Puffer, pH 8,0 mit 150 mM NaCl und 0,09% (w/v) Natriumazid.

Nach gutem Mischen kam das Gemisch für zwanzig Minuten auf Eis. Nach dieser Inkubationszeit wurden 2 ml des 1:10 verdünnten FACS™ Lysis Konzentrates (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) zur Erythrozytolyse hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Inkubationszeit wurden die FACS-Röhrchen mit 3 ml FACS Puffer aufgefüllt und dann bei 1100 U/min während

zehn Minuten zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen, und nach Auffüllen mit 5 ml FACS Puffer folgte ein erneutes Zentrifugieren der Zellsuspension bei 1100 U/min über zehn Minuten. Erneut wurde der Überstand verworfen.

In einem letzten Schritt wurden die Zellen mit 100 µl zweiprozentigem Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt) fixiert.

Zur durchflusszytometrischen Untersuchung wurde das Gerät FACScan™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) verwendet. Auf der Softwareseite kamen das Programm Lysis II Version 1.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) unter dem HP Pascal 3.22 (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) Betriebssystem und das Programm Cellquest Version 3.1 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) unter dem Betriebssystem Macintosh System Software 7.6.1 (Apple, Cupertino, CA, USA) zum Einsatz.

In einem Probedurchlauf wurden einige zehntausend Zellen eingelesen. Es folgte die Eingrenzung der Lymphozytenpopulation (Region R1). Innerhalb der Lymphozytenpopulation wurden anschließend jeweils 10.000 Zellen pro Ansatz ausgewertet.

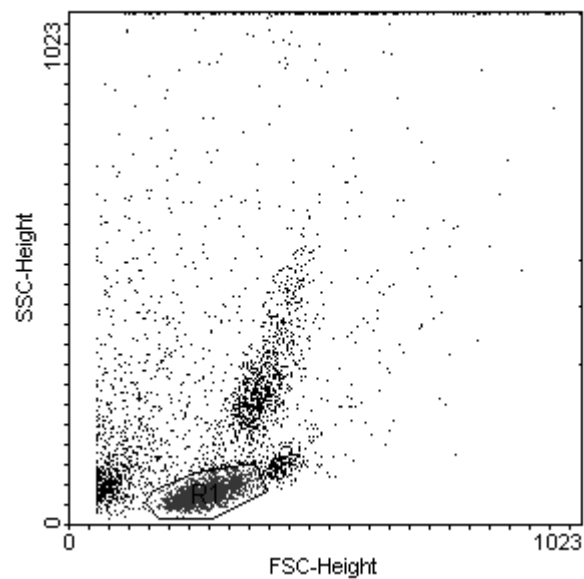


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Analyse CD11a-genmutierter Mäuse: Eingrenzung der Lymphozytenpopulation nach SSC/FSC-Profil zur weiteren Analyse

Die Differenzierung zwischen CD11a-genmutierten und Wildtyp Mäusen erfolgte anhand der in Form von Histogrammen (Abszisse: FL1-H Fluoreszenzintensität, Ordinate: Zellzahl) dargestellten Daten.

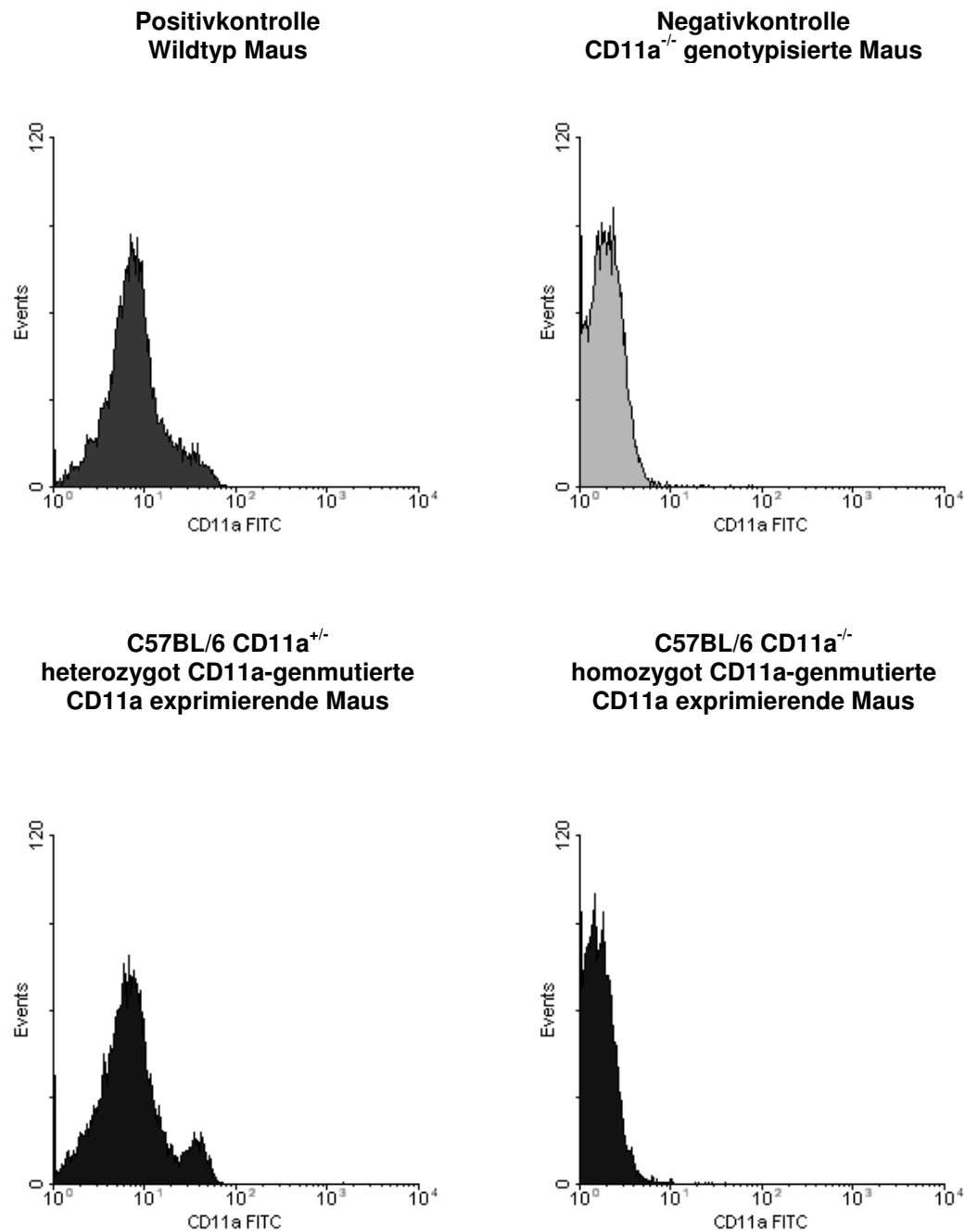


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse peripherer Blutlymphozyten: FACS-Darstellung zur Untersuchung der CD11a Expression auf Lymphozyten aus CD11a^{+/+}, CD11a^{+/-} und CD11a^{-/-} Mäusen. Lebende Lymphozyten wurden nach SSC und FSC gated. CD11a wurde mit FITC-konjugierten monoklonalen anti-CD11a Antikörpern dargestellt. Es fand sich kein Nachweis einer CD11a Expression auf Lymphozyten homozygot CD11a-genmutierter Mäuse.

3.3. Zelltransplantation

Zur Untersuchung der Bedeutung von LFA-1 in der allogenen Knochenmark- und Stammzelltransplantation wurden mehrere Versuchsansätze gewählt. Während die BALB/c Mäuse sich in ihrem Major Histocompatibility Complex (MHC) von den C57BL/6 Mäusen unterscheiden, besteht zwischen C57BL/6 und BALB.B Mäusen nur ein Unterschied im minor Histocompatibility Complex (miHC).

a) Major Histocompatibility (MHC) Inkompatibilität:

Bedeutung von LFA-1 auf Spenderzellen:

C57BL/6 nach BALB/c

Transplantation von

Milzzellen

Knochenmarkzellen

Milz- und Knochenmarkzellen

Bedeutung von LFA-1 auf Empfängerzellen:

BALB/c nach C57 BL/6

Transplantation von

Milz- und Knochenmarkzellen

b) minor Histocompatibility (miHC) Inkompatibilität:

Bedeutung von LFA-1 auf Spenderzellen:

C57BL/6 nach BALB.B

Transplantation von

Milzzellen

Etwa 5 Stunden vor der Transplantation wurden die Empfängertiere letal bestrahlt um ein nachfolgendes Engraftment der Spenderzellen zu gewährleisten. Die Bestrahlung wurde in einem Blutbestrahlungsgerät Irradiator OB 29/4 mit einer Cs-137 Strahlenquelle durchgeführt. Die Mäuse befanden sich dabei auf einer 40 mm dicken Styropor-Platte innerhalb des Bestrahlungsbehälters. Anhand des zum Zeitpunkt der Bestrahlung gültigen Dosimetrie-Protokolls ergab sich eine mittlere Dosis von 27,58 Gy bei einer Bestrahlungszeit von 490 Sekunden unter der Annahme einer Mausdicke von 18,5 mm, entsprechend 56,2 mGy/s.

Mausstamm	Strahlendosis	Bestrahlungszeit
BALB/c	6,5 Gy	115,5 sec.
BALB.B	8,25 Gy	146,6 sec.
C57BL/6	9,25 Gy	164,3 sec.

Tabelle 4: Letale Strahlendosis: Aufschlüsselung der für die einzelnen Mausstämme verwendeten Strahlendosen und Bestrahlungszeiten

Als Medium für die zu transplantierenden Zellen wurde Hanks balancierte Salz Lösung (modifiziert, Sigma, St. Louis, MO, USA) mit einprozentig ACD-A Stabilisator (Fresenius, Bad Homburg) verwendet.

Ein Liter Hanks balancierte Salz Lösung enthält:

- 0,4 g KCl
- 0,06 g KH_2PO_4
- 0,35 g NaHCO_3
- 8,0 g NaCl
- 0,04788 g Na_2HPO_4
- 1,0 g D-Glucose
- 0,011 g Phenol Rot-Na

Ein Liter ACD-A Stabilisator nach USOP Form A zur Herstellung von Blutkonserven und Blutzellkonzentraten sowie zur Verwendung als Antikoagulanzlösung enthält:

- 22,0 g Natriumcitrat H_2O
- 7,3 g Zitronensäure
- 24,5 g Glucose H_2O

Zur Gewinnung von Knochenmark- und Milzzellen wurde die Spendermaus durch zervikale Dislokation getötet.

Nach Desinfektion der Bauchhaut mit 70 prozentigem Äthanol wurde die Milz herauspräpariert. Das explantierte Organ wurde in eiskaltes Medium überführt. Nach Anstechen der Milzkapsel mit einer 19G Kanüle wurden die Zellen durch

die entstandene Öffnung vorsichtig mit zwei abgeknickten 19G Kanülen aus der Milzkapsel ausgestrichen.

Zur Gewinnung der Knochenmarksuspension wurden die langen Röhrenknochen der vorderen und hinteren Oberschenkel herauspräpariert und in eiskaltes Medium überführt. Mit Hilfe eines sterilen Skalpells wurden beide Enden der Knochen entfernt, der freiliegende Knochenmarkkanal mit einer 23G Kanüle sondiert und mehrfach mit Medium durchspült.

Die so gewonnenen Zellen aus Milz und Knochenmark wurden jeweils getrennt mit Hilfe einer Mikropipette in Suspension gebracht und zur Eliminierung von Zellagragaten und knöchernen Bestandteilen durch einen Cell Strainer (70 μ m Nylon, steril, gamma bestrahlt, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) filtriert. Die Zellen wurden zweimal in Hanks/ACD-A gewaschen und auf Eis gelagert.

Zur Bestimmung der Leukozytenzahl wurden in einem Testansatz die Erythrozyten lysiert. Hierzu wurden einige Mikroliter Zellsuspension im Verhältnis 1:10 mit 0,3 prozentiger Essigsäure vermischt. Die Zellen wurden lichtmikroskopisch in der Neubauer Kammer ausgezählt. Die Milzpräparate enthielten zwischen $0,23 \cdot 10^8$ und $4,77 \cdot 10^8$, die Knochenmarkpräparate zwischen $0,18 \cdot 10^8$ und $1,62 \cdot 10^8$ Leukozyten. Es folgte die Einstellung der für die Transplantation gewünschten Zellkonzentration. Hierzu wurde die pro Maus zu injizierende Zahl nichterythrozytärer Zellen in 300 μ l Hanks resuspendiert. Auf eine Erythrozytenlyse oder Abtrennung der Erythrozyten aus den Transplantaten wurde verzichtet.

Transplantation	Zellart	Einzustellende Zellzahl in 300 μ l
<u>MHC-Inkompatibilität</u>		
C57BL/6 nach BALB/c	Milz	$1,6 - 3,0 \cdot 10^7$ Zellen
	Knochenmark	$4,2 \cdot 10^6$ Zellen
	Milz und Knochenmark	Milz: $1,8 \cdot 10^6$ Zellen KM: $4,2 \cdot 10^6$ Zellen
BALB/c nach C57BL/6	Milz und Knochenmark	Milz: $1,8 \cdot 10^6$ Zellen KM: $4,2 \cdot 10^6$ Zellen
<u>miHC-Inkompatibilität</u>		
C57BL/6 nach BALB.B	Milz	$3,0 \cdot 10^7$ Zellen

Tabelle 5: Transplantierte Zellzahlen: Abhängig vom jeweiligen Protokoll einzustellende Zellzahl in 300 μ l, aufgeschlüsselt nach Zellart (Milzzellen oder Knochenmarkzellen)

Der Schwanz der bestrahlten Empfängerermäuse wurde mit Äthanol desinfiziert. In eine geeignete Schwanzvene wurden dann die 300 μ l der eingestellten Zellsuspension gespritzt. Die Kontrollmäuse wurden nur bestrahlt; ihnen wurden keine Zellen implantiert.

Die transplantierten Empfängerermäuse kamen erneut in autoklavierte Käfige mit sterilem Streu und Wasser mit Ciprobay® (Bayer, Leverkusen). Sie wurden anfangs täglich, in der Folgezeit dann weiter engmaschig überwacht. Erfasst wurden Gewicht, Stuhlverhalten, Fell- und Hautveränderungen sowie der Allgemeinzustand. Streu, Wasser und Käfige wurden regelmäßig gewechselt. Am Todestag wurden Lunge, Leber, Milz, Darm und Zunge zur histopathologischen Begutachtung entnommen.

3.4. Durchflusszytometrische Kontrolle des Engraftments

Frühstens 8 Tage nach Transplantation erfolgte die Entnahme von 20 µl Schwanzvenenblut zur durchflusszytometrischen Engraftment-Kontrolle. Als Antikörper dienten anti-H-2K^b (C57BL/6) und anti-H-2K^d (BALB/c) Antikörper.

a) Monoklonale R-Phycoerythrin (R-PE) konjugierte Maus anti-Maus H-2K^b Antikörper (PharMingen, San Diego, CA, USA):

- Katalognummer: 06105A, 0.1 mg
- Klon: AF6-88.5
- immunogen: C57BL Maus Milzzellen
- Isotyp: Maus (BALB/c) IgG_{2a},κ
- Inhalt: R-PE-konjugiertes Immunglobulin in 10 mM Phosphat Puffer, pH 7,2 mit 150 mM NaCl und 0,09% (w/v) Natriumazid.

b) Monoklonale Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugierte Maus anti-Maus H-2K^d Antikörper (PharMingen, San Diego, CA, USA):

- Katalognummer: 06094D, 0.5 mg
- Klon: SF1-1.1
- immunogen: BALB/c Maus Zellen
- Isotyp: Maus (SJL) IgG_{2a},κ
- Inhalt: FITC-konjugiertes Immunglobulin in 50 mM Tris Puffer, pH 8,0 mit 150 mM NaCl und 0,09% (w/v) Natriumazid.

3. Material und Methodik

Die Zellen wurden mit gereinigten monoklonalen Ratten anti-Maus CD16/CD32 (FcγIII/II Rezeptor) Antikörpern (Fc Block[®], PharMingen, San Diego, CA, USA) vorinkubiert. Diese verhinderten eine nicht antigenspezifische Bindung von Immunglobulinen an die FcγIII und FcγII Rezeptoren (CD16/CD32) der Mausleukozyten.

Fc Block[®] (PharMingen, San Diego, CA, USA):

- Katalognummer: 01241A, 0.1 mg; 01241D, 0.5 mg
- Klon: 2.4G2
- immunogen: BALB/c Maus Makrophagen Zelllinie J774
- Isotyp: Ratte (Sprague-Dawley) IgG_{2b},κ
- Inhalt: gereinigtes Immunglobulin in 10 mM Phosphat Puffer, pH 7,2 mit 150 mM NaCl und 0,09% (w/v) Natriumazid.

3. Material und Methodik

Die Ergebnisse wurden anhand von Dot-Plots (Abszisse: anti-H-2^d R-Phycoerythrin, Ordinate: anti-H-2^b Fluorescein Isothiocyanat) dargestellt.

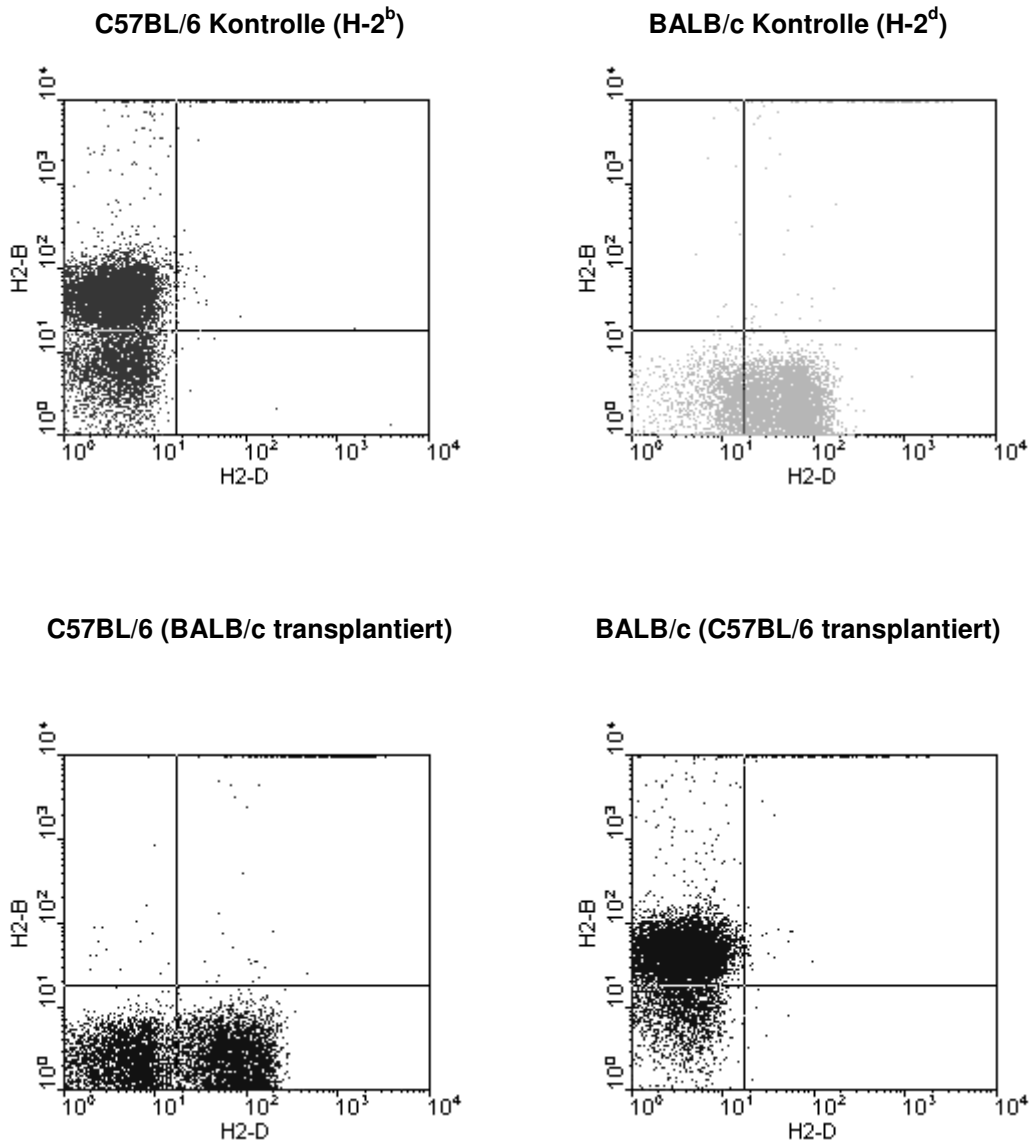


Abbildung 7: Durchflusszytometrische Engraftment-Kontrolle an peripheren Blut-lymphozyten: Die Lymphozyten von C57BL/6 Mäusen zeigten nach Transplantation von BALB/c-Zellen eine H-2^d-Expression und waren negativ für H-2^b. Umgekehrt waren die BALB/c Mäuse nach Transplantation mit C57BL/6 Spenderzellen erwartungsgemäß positiv für H-2^b und negativ für H-2^d.

3.5. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Überlebenszeiten erfolgte mit SPSS® (SPSS, Chicago, IL, USA) unter Verwendung des Log-Rank Tests. Es wurde eine Kaplan-Meier Überlebensanalyse der einzelnen Datensätze durchgeführt. Durchschnitte, Mediane, 95 % Konfidenzintervalle und Signifikanz wurden von SPSS errechnet.

Die grafische Darstellung der Gewichtsverläufe erfolgte mit Microsoft Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA).

4. Ergebnisse

4.1. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Spenderzellen:

Major Histocompatibility (MHC) Inkompatibilität

Untersucht wurde die Bedeutung der LFA-1 Expression auf Spenderzellen bei der Entstehung und Ausprägung einer GvHD nach allogener Knochenmark- und Milzzelltransplantation. Hierzu wurden letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d) mit Zellen von C57BL/6 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} Mäusen H-2^b transplantiert. Es wurden entweder Milzzellen, Knochenmarkzellen oder eine Gemisch aus Knochenmark- und wenigen Milzzellen transplantiert.

4.1.1. Transplantation von Milzzellen

Standardmäßig werden zur Untersuchung einer GvHD relativ hohe Milzzellzahlen mit hohem Anteil an T-Zellen transplantiert. Hierdurch kommt es zu einem sicheren Engraftment, jedoch auch zur raschen Entwicklung einer GvHD. Es wurden Milzzellen von LFA-1-defizienten und -exprimierenden C57BL/6 (H-2^b) Mäusen in letal bestrahlte BALB/c (H-2^d) Mäuse transplantiert. Es konnte für Mäuse, die von LFA-1-defizienten Tieren transplantiert wurden, kein Vorteil bezüglich mittlerer Überlebenszeit und –anzahl gegenüber denen, die durch Wildtypzellen rekonstituiert wurden, gefunden werden. Die Gewichtsverläufe der Empfängertiere zeigten nach der Transplantation eine rasche irreversible Gewichtsabnahme.

Spender: - 8 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 8 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)
Empfänger: - 16 x BALB/c (H-2^d)
Kontrollen: - 4 x BALB/c (H-2^d)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfractionierte Bestrahlung mit 6,5 Gy

Anzahl transplanteder Leukozyten: - $1,6 \cdot 10^7$ Milzzellen pro Empfängermaus (4 Tiere)
- $3 \cdot 10^7$ Milzzellen pro Empfängermaus (4 Tiere)
- Kontrollmäuse nur bestrahlt

Engraftment: - Untersuchung an Tag 8 nach Transplantation und postmortal
- 4 der 4 getesteten Empfängermäusen zeigten 8 Tage nach Transplantation einen 100-prozentigen Spenderchimärismus mit ausschließlich H-2^b-Expression
- Davon 3 Mäuse C57BL/6 CD11a^{-/-} transplantiert
1 Maus C57BL/6 CD11a^{+/-} transplantiert

4. Ergebnisse

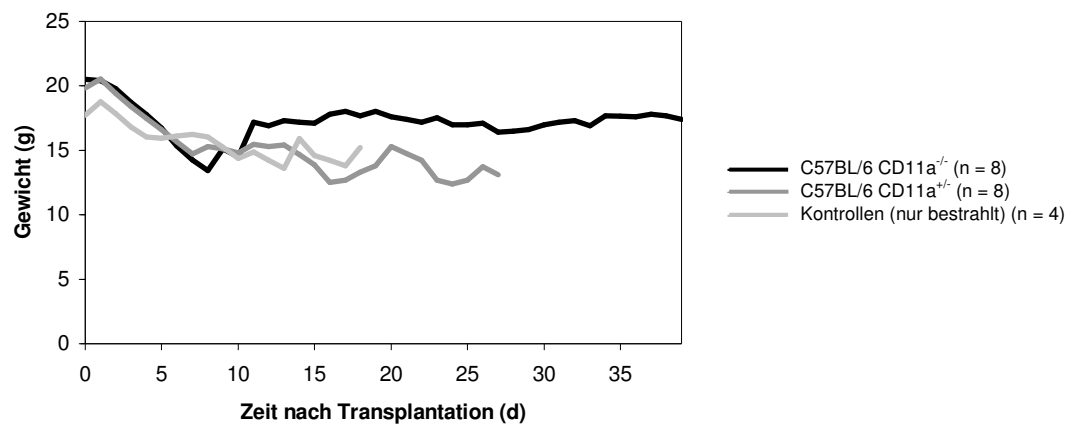


Abbildung 8: Gewichtsverlauf der Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $1,6 - 3 \cdot 10^7$ Milzzellen von jeweils 8 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung. Verstorbene Mäuse wurden für den Zeitpunkt der letzten Gewichtskontrolle zensiert.

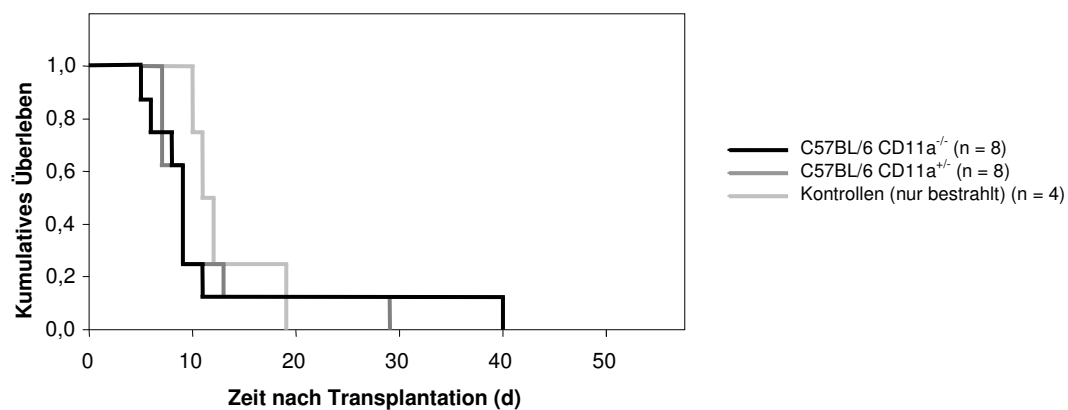


Abbildung 9: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $1,6 - 3 \cdot 10^7$ Milzzellen von jeweils 8 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung.

4. Ergebnisse

	Anzahl (n)	Mean (d)	95% CI	Median (d)	95% CI
C57BL/6 CD11a ^{-/-}	8	12,1	4,2 – 20,0	9	8,2 – 9,8
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	8	11,3	6,1 – 16,4	9	7,4 – 10,6
Kontrollen (nur bestrahlt)	4	13,0	9,0 – 17,0	11	9,0 – 13,0

Tabelle 6: Mittlere (Mean) und mediane (Median) Überlebenszeit nach Knochenmarktransplantation: Angabe der Anzahl der Tiere und 95% Konfidenzintervalle (CI).

	C57BL/6 CD11a ^{-/-}	C57BL/6 CD11a ^{+/-}
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	0,01 (0,9370)	
Kontrollen (nur bestrahlt)	0,93 (0,3349)	0,38 (0,5370)

Tabelle 7: Log-Rank Statistik mit Signifikanzangabe (p-Werte in Klammern) der Überlebensanalyse. Zwischen den transplantierten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Überleben. Zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Tieren fand sich ebenfalls kein Unterschied im Überleben.

4.1.2. Transplantation von Knochenmarkzellen

Die Ergebnisse der Transplantation mit $4,2 \cdot 10^6$ allogenen Knochenmarkzellen in letal bestrahlte BALB/c Mäuse zeigte keinen statistischen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen. Der Gewichtsverlauf der einzelnen Gruppen zeigte eine rasche anfängliche Gewichtsabnahme mit anschließender Normalisierung. Alle Langzeitüberlebenden zeigten eine Sklerose der Haut und eine Kataraktbildung. Die nur bestrahlten Mäuse, die nicht transplantiert wurden, verstarben innerhalb weniger Tage.

Spender: - 8 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 8 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)
Empfänger: - 17 x BALB/c (H-2^d)
Kontrolle: - 1 x BALB/c (H-2^d)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfractionierte Bestrahlung mit 6,5 Gy

Anzahl transplanteder Leukozyten: - $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkzellen pro Empfängermaus
- Kontrollmaus nur bestrahlt

Engraftment: - Untersuchung an Tag 14, 184 + 216 nach Transplantation
- 8 der 8 getesteten Empfängermäusen zeigten 8 Tage nach Transplantation einen 100-prozentigen Spenderchimerismus mit ausschließlich H-2^b-Expression
- Davon 4 Mäuse C57BL/6 CD11a^{-/-} transplantiert
4 Mäuse C57BL/6 CD11a^{+/-} transplantiert
- Bei jeweils 2 von 2 Mäusen jeder Gruppe, die zu diesem Zweck an Tag 14 getötet wurden, war ein erfolgreiches 100-prozentiges Engraftment auch in Milz und Knochenmark nachweisbar.

4. Ergebnisse

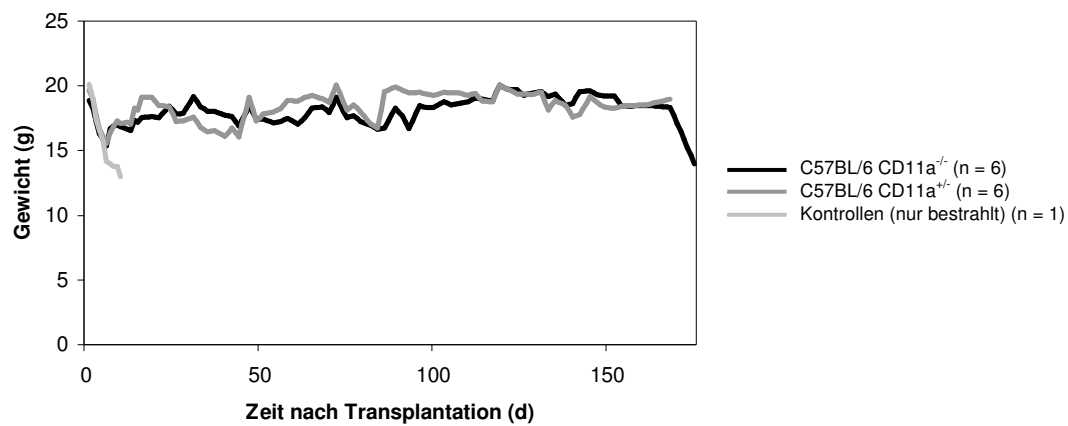


Abbildung 10: Gewichtsverlauf der Knochenmarktransplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkszellen von jeweils 6 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung. Verstorbene Mäuse wurden für den Zeitpunkt der letzten Gewichtskontrolle zensiert.

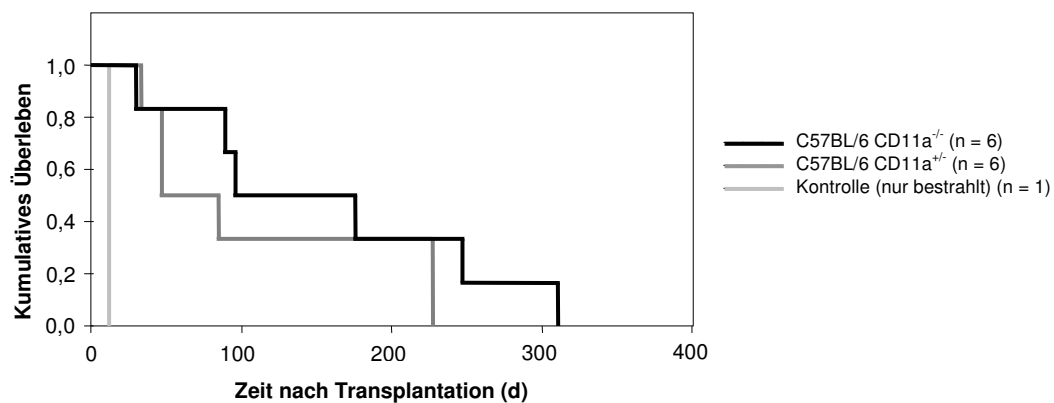


Abbildung 11: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Knochenmarktransplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkszellen von jeweils 6 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung.

4. Ergebnisse

	Anzahl (n)	Mean (d)	95% CI	Median (d)	95% CI
C57BL/6 CD11a ^{-/-}	6	158	73,1 – 242,9	96	0 – 200,4
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	6	111	37,8 – 184,2	47	5,4 – 88,6
Kontrolle (nur bestrahlt)	1	12	12 – 12	12	

Tabelle 8: Mittlere (Mean) und mediane (Median) Überlebenszeit nach Knochenmarktransplantation: Angabe der Anzahl der Tiere und 95% Konfidenzintervalle (CI).

	C57BL/6 CD11a ^{-/-}	C57BL/6 CD11a ^{+/-}
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	1,12 (0,2902)	
Kontrolle (nur bestrahlt)	6,00 (0,0143)*	6,00 (0,0143)*

Tabelle 9: Log-Rank Statistik mit Signifikanzangabe (p-Werte in Klammern) der Überlebensanalyse. Signifikante Unterschiede zwischen transplantierten Gruppen sind mit * gekennzeichnet. Eine signifikante Lebensverlängerung zeigten alle transplantierten Tiere gegenüber den nur bestrahlten Mäusen. Zwischen den transplantierten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Überleben.

4.1.3. Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen

Transplantiert wurden jeweils $4,2 \cdot 10^6$ allogene Knochenmarkzellen und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen einer Spendermaus. Bei der Mehrzahl der Tiere kam es zur raschen Manifestation einer letal verlaufenden GvHD, ohne erkennbaren Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. In beiden transplantierten Gruppen gab es einzelne Langzeitüberlebende mit Zeichen einer Sklerosierung der Haut und Kataraktbildung. Das Gewicht normalisierte sich im Verlauf nicht vollständig.

Spender: - 14 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 14 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)
Empfänger: - 32 x BALB/c (H-2^d)
Kontrollen: - 4 x BALB/c (H-2^d)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfractionierte Bestrahlung mit 6,5 Gy

Anzahl transplantierter Leukozyten: - $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkzellen und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen pro Empfängermaus
- Kontrollmäuse nur bestrahlt

Engraftment: - Untersuchung an Tag 16, 18, 31 + 111 nach Transplantation
- 17 der 17 getesteten Empfängermäusen zeigten nach Transplantation einen 100-prozentigen Spenderchimärismus mit ausschließlich H-2^b-Expression
- Davon 10 Mäuse C57BL/6 CD11a^{-/-} transplantiert
7 Mäuse C57BL/6 CD11a^{+/-} transplantiert

4. Ergebnisse

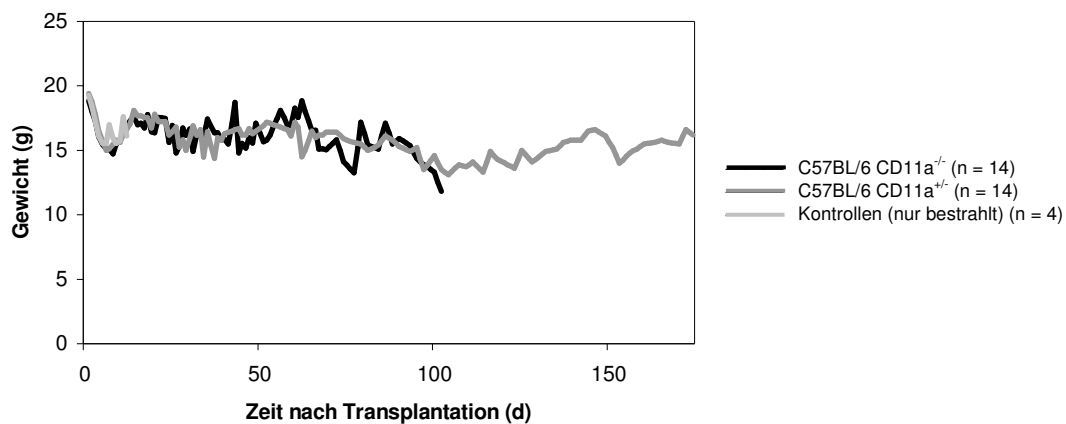


Abbildung 12: Gewichtsverlauf der Knochenmark- und Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmark- und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen von jeweils 14 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung. Verstorbene Mäuse wurden für den Zeitpunkt der letzten Gewichtskontrolle zensiert.

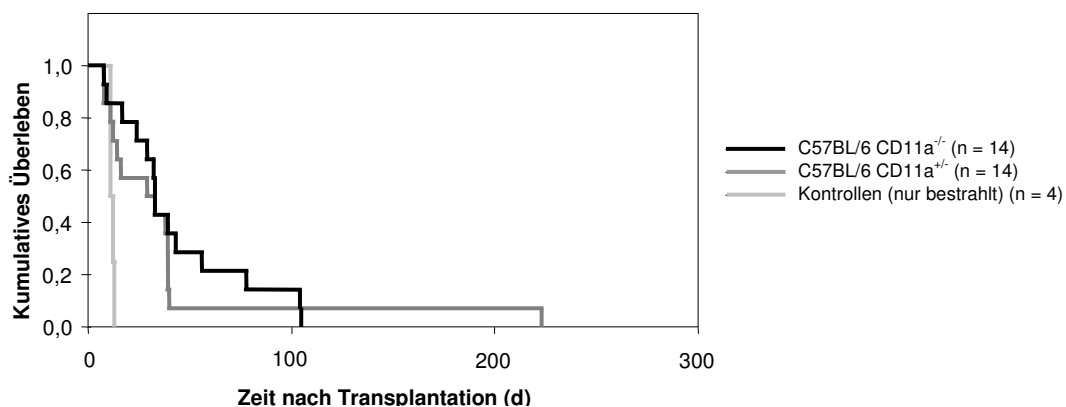


Abbildung 13: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Knochenmark- und Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmark- und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen von jeweils 14 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c Mäuse (H-2^d). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung.

4. Ergebnisse

	Anzahl (n)	Mean (d)	95% CI	Median (d)	95% CI
C57BL/6 CD11a ^{-/-}	14	43,6	27,1 – 60,1	33	31,2 – 60,1
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	14	39,1	10,6 – 67,7	29	0 – 58,3
Kontrollen (nur bestrahlt)	4	11,8	10,8 – 12,7	11	

Tabelle 10: Mittlere (Mean) und mediane (Median) Überlebenszeit nach Knochenmark- und Milzelltransplantation: Angabe der Anzahl der Tiere und 95% Konfidenzintervalle (CI).

	C57BL/6 CD11a ^{-/-}	C57BL/6 CD11a ^{+/-}
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	0,47 (0,4938)	
Kontrollen (nur bestrahlt)	8,89 (0,0029)*	5,11 (0,0238)*

Tabelle 11: Log-Rank Statistik mit Signifikanzangabe (p-Werte in Klammern) der Überlebensanalyse. Signifikante Unterschiede zwischen transplantierten Gruppen sind mit * gekennzeichnet. Eine signifikante Lebensverlängerung zeigten alle transplantierten Tiere gegenüber den nur bestrahlten Mäusen. Zwischen den transplantierten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Überleben.

4.1.4. Syngene Kontrolltransplantation

Es wurde zusätzlich zu den bereits erwähnten Transplantationen eine syngene Kontrolltransplantation (BALB/c nach BALB/c) durchgeführt, um die Sterblichkeit aufgrund von Bestrahlung und Umwelteinflüssen, wie Infektionen, zu erfassen. Es wurden 8 Mäuse in einer Versuchsreihe syngen mit Knochenmark- und Milzzellen transplantiert. Zwei Kontrollmäuse wurden nur bestrahlt, ohne im Anschluß transplantiert zu werden. Alle transplantierten Tiere überlebten länger als 50 Tage nach Transplantation. Die beiden nicht transplantierten Tiere starben jeweils an Tag 15 und an Tag 20.

Spender: - 8 x BALB/c (H-2^d)
Empfänger: - 8 x BALB/c (H-2^d)
Kontrollen: - 2 x BALB/c (H-2^d)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfraktionierte Bestrahlung mit 6,5 Gy

Anzahl transplantierter Leukozyten: - $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkzellen und $1,8 \cdot 10^6$
Milzzellen pro Empfängermaus
- Kontrollmäuse nur bestrahlt

4.2. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Spenderzellen:

minor Histocompatibility (miHC) Inkompatibilität

Transplantation von Milzzellen

Die bisherigen Versuche basierten auf einer Transplantation zwischen Mausstämmen mit unterschiedlichem MHC-Komplex. In diesem Versuchsansatz zeigten Spender und Empfänger den gleichen MHC, jedoch einen unterschiedlichen miHC. Auch hier fand sich kein Hinweis auf eine Beeinflussung der GvHD Entwicklung durch fehlende Expression von LFA-1 auf den Spenderzellen. In beiden Gruppen kam es zu einer raschen irreversiblen Gewichtsabnahme.

Spender: - 8 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 8 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)
Empfänger: - 20 x BALB.B (H-2^b)
Kontrollen: - 4 x BALB.B (H-2^b)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfraktionierte Bestrahlung mit 8,25 Gy

Anzahl transplanteder Leukozyten: - $3 \cdot 10^7$ Milzzellen pro Empfängermaus
- Kontrollmäuse nur bestrahlt

4. Ergebnisse

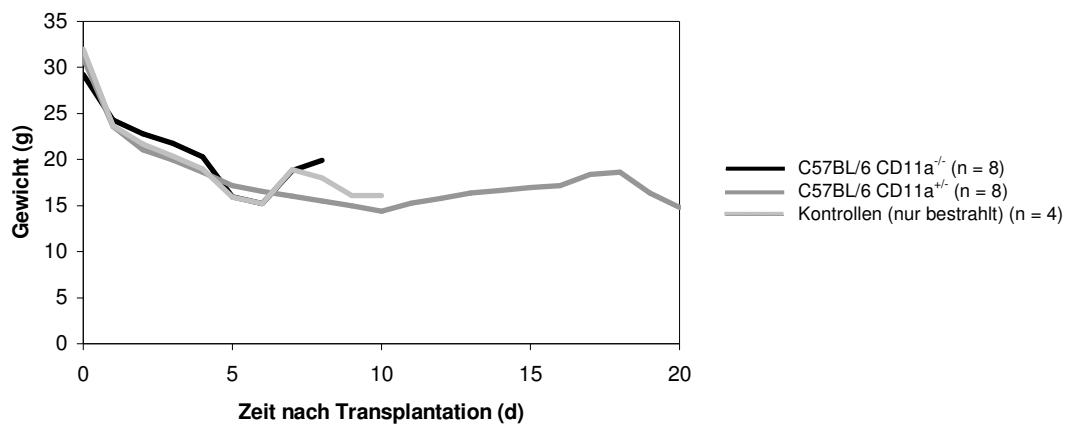


Abbildung 14: Gewichtsverlauf der Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $3 \cdot 10^7$ Milzzellen von jeweils 8 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB.B Mäuse (H-2^b). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung. Verstorbene Mäuse wurden für den Zeitpunkt der letzten Gewichtskontrolle zensiert.

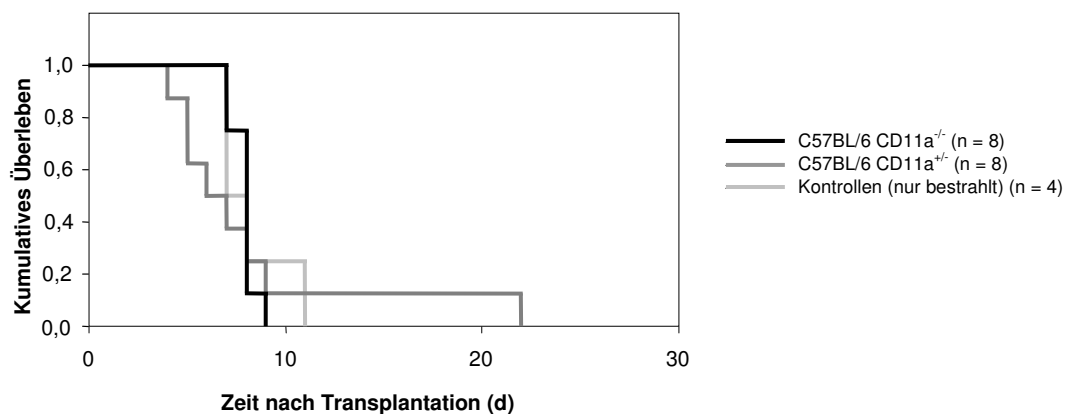


Abbildung 15: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $3 \cdot 10^7$ Milzzellen von jeweils 8 CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in letal bestrahlte BALB.B Mäuse (H-2^b). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung.

4. Ergebnisse

	Anzahl (n)	Mean (d)	95% CI	Median (d)	95% CI
C57BL/6 CD11a ^{-/-}	8	7,9	7,4 – 8,3	8	7,6 – 8,4
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	8	8,3	4,2 – 12,3	6	3,2 – 8,8
Kontrollen (nur bestrahlt)	4	8,3	6,4 – 10,1	7	

Tabelle 12: Mittlere (Mean) und mediane (Median) Überlebenszeit nach Knochenmark- und Milzelltransplantation: Angabe der Anzahl der Tiere und 95% Konfidenzintervalle (CI).

	C57BL/6 CD11a ^{-/-}	C57BL/6 CD11a ^{+/-}
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	0,32 (0,5686)	
Kontrollen (nur bestrahlt)	0,09 (0,7626)	0,18 (0,6707)

Tabelle 13: Log-Rank Statistik mit Signifikanzangabe (p-Werte in Klammern) der Überlebensanalyse. Zwischen den transplantierten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Überleben. Zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Tieren fand sich ebenfalls kein Unterschied im Überleben.

4.3. Bedeutung der LFA-1 Expression auf Empfängerzellen:

Major Histocompatibility (MHC) Inkompatibilität

Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen

LFA-1 wird nicht nur auf Lymphozyten, sondern auch auf Antigen-präsentierenden-Zellen exprimiert. Um die Bedeutung der LFA-1 Expression auf Empfängerzellen im Rahmen einer GvHD zu untersuchen, transplantierten wir $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmark- und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen von BALB/c (H-2^d) Mäusen in LFA-1 Exprimierende- und LFA-1-defiziente C57BL/6 Mäuse. Auch hier fand sich kein Überlebensvorteil für eine der beiden Gruppen.

Spender: - 12 x BALB/C (H-2^d)
Empfänger: - 6 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 6 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)
Kontrollen: - 1 x C57BL/6 CD11a^{-/-} (H-2^b)
- 1 x C57BL/6 CD11a^{+/-} (H-2^b)

Um individualspezifische Merkmale zum Beispiel durch Infektion zu minimieren wurde jeweils ein Empfängertier von einer Spendermaus transplantiert.

Empfängerkonditionierung: Einmalige unfraktionierte Bestrahlung mit 9,25 Gy

Anzahl transplantierter Leukozyten: - $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmarkzellen und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen pro Empfängermaus
- Kontrollmäuse nur bestrahlt

Engraftment: - Untersuchung an Tag 18, 22 + 50 nach Transplantation
- 6 der 6 getesteten Empfängermäusen zeigten nach Transplantation einen 100-prozentigen Spenderchimärismus mit ausschließlich H-2^d-Expression
- Davon 5 Mäuse nach C57BL/6 CD11a^{-/-} transplantiert
2 Mäuse nach C57BL/6 CD11a^{+/-} transplantiert

4. Ergebnisse

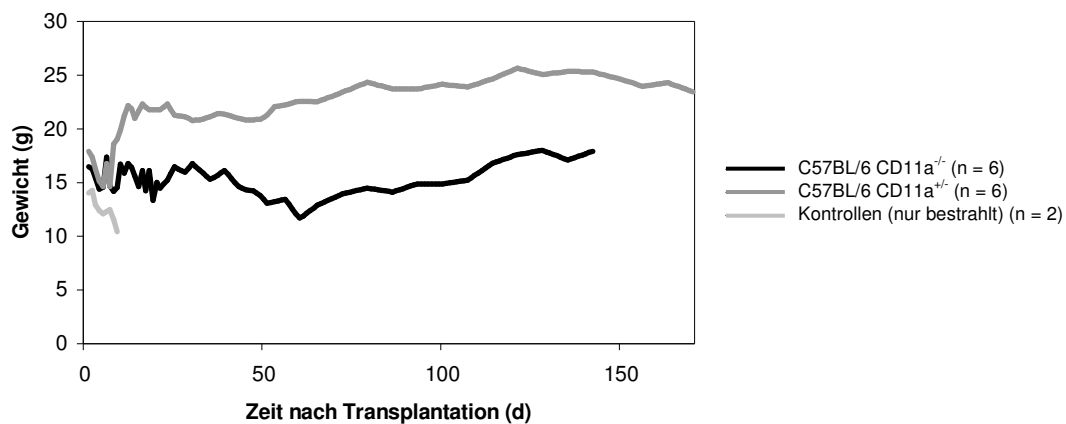


Abbildung 16: Gewichtsverlauf der Knochenmark- und Milzzelltransplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmark- und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen von 12 BALB/c Mäusen (H-2^d) in jeweils 6 letal bestrahlte CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäuse (H-2^b). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung. Verstorbene Mäuse wurden für den Zeitpunkt der letzten Gewichtskontrolle zensiert.

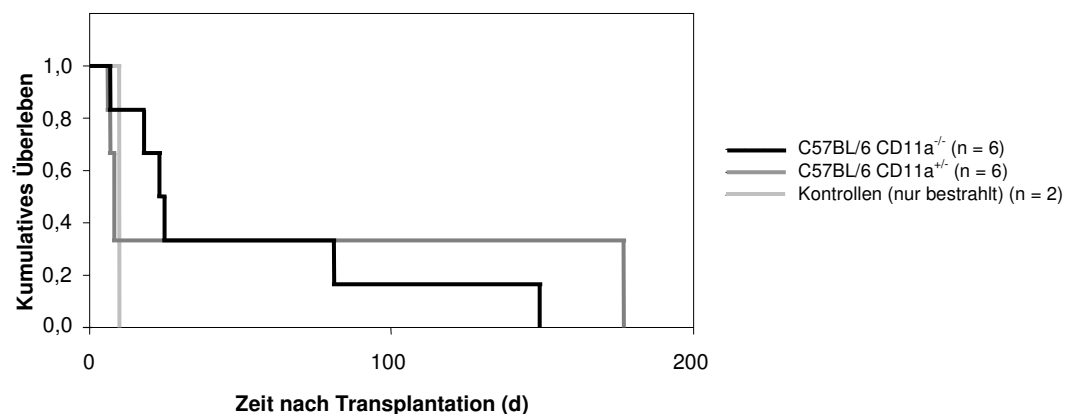


Abbildung 17: Kaplan-Meier Überlebenskurven der Knochenmark- und Milzzell-transplantierten Mäuse: Transplantation von $4,2 \cdot 10^6$ Knochenmark- und $1,8 \cdot 10^6$ Milzzellen von 12 BALB/c Mäusen (H-2^d) in jeweils 6 letal bestrahlte CD11a^{-/-} und CD11a^{+/-} C57BL/6 Mäuse (H-2^b). Bestrahlte, aber nicht rekonstituierte, Mäuse dienten als Kontrolle für die Effizienz der Konditionierung.

4. Ergebnisse

	Anzahl (n)	Mean (d)	95% CI	Median (d)	95% CI
C57BL/6 CD11a ^{-/-}	6	50,5	6,7 – 94,3	23	14,6 – 31,4
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	6	63,8	0 – 134,0	8	6,9 – 9,1
Kontrollen (nur bestrahlt)	2	10,0	10,0 – 10,0	10	

Tabelle 14: Mittlere (Mean) und mediane (Median) Überlebenszeit nach Knochenmark- und Milzelltransplantation: Angabe der Anzahl der Tiere und 95% Konfidenzintervalle (CI).

	C57BL/6 CD11a ^{-/-}	C57BL/6 CD11a ^{+/-}
C57BL/6 CD11a ^{+/-}	0,10 (0,7480)	
Kontrollen (nur bestrahlt)	2,63 (0,1047)	0,04 (0,8456)

Tabelle 15: Log-Rank Statistik mit Signifikanzangabe (p-Werte in Klammern) der Überlebensanalyse. Zwischen den transplantierten Gruppen fand sich kein signifikanter Unterschied im Überleben. Zwischen transplantierten und nicht-transplantierten Tieren fand sich ebenfalls kein Unterschied im Überleben.

5. Diskussion

LFA-1 ist bei einer Vielzahl immunologischer Prozesse involviert. Am besten untersucht ist hierbei die Rolle bei Leukozytenmigration und T-Zell Aktivierung. Zahlreiche Untersuchungen, mit teils widersprüchlichen Aussagen, zur Bedeutung von LFA-1, sowohl zur Adhäsion als auch zur Kostimulation liegen vor. Eine eindeutige Trennung beider Funktionen war bisher nicht möglich.

Erste Hinweise auf eine herausragende Bedeutung von LFA-1 in der Immunabwehr ergaben sich aus Untersuchungen an LAD-1 Patienten, die, aufgrund einer Mutationen in der β_2 -Integrinkette, LFA-1, Mac-1, p150,95 und $\alpha_D\beta_2$ nicht exprimieren. Diese Patienten leiden häufig an bakteriellen und fungalen Infekten (ANDERSON et al., 1985; FISCHER et al., 1988). Auch bei CD11a homozygot genmutierten Mäusen kommt es bei Fehlen von LFA-1 zu einer verzögerten oder abgeschwächten allogenen T-Zell-Proliferation und Immunantwort (SCHMITS et al., 1996).

Die Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD) bleibt eine der häufigsten Komplikation nach allogener Knochenmarktransplantation. „Natural Killer“ (NK) Zellen und Spender-T-Zellen scheinen die wichtigsten Effektorzellen der GvHD zu sein. Beide Zellreihen tragen auf ihrer Oberfläche das „Leukocyte Function Associated Antigen-1“ (LFA-1). Sehr früh während der GvHD kommt es, zumindest im Mausmodell, zur Hochregulation von ICAM-1 auf Endothelzellen und im Folgenden zu einem Anstieg von LFA-1 exprimierenden Zellen (SCHILTZ et al., 1994).

Multiple Substanzen können die Expression und Funktion von LFA-1 beeinflussen.

Antiinflammatorische Substanzen wie Glucocorticoide oder Salicylate inhibieren zusätzlich zu ihrer antientzündlichen Wirkung auf verschiedensten Wegen die Expression von Adhäsionsmolekülen, insbesondere die von ICAM-1, dem dominierenden Liganden von LFA-1 auf aktivierten Endothelzellen (KOPP et al., 1994; PIERCE et al., 1996; GERLI et al., 1998; MORI et al., 1999).

Auch Statine und ihre Derivate scheinen, indem sie an die I-Domäne von LFA-1 binden, die Interaktion von LFA-1 und seinen Liganden zu beeinflussen (WEITZ-SCHMIDT et al., 2001; FRENETTE et al., 2001; MCCAREY et al., 2001; NISHIBORI et al., 2003). Einzelne Studien zur Herz- oder Nierentransplantation konnten einen positiven Effekt von Pravastatin zeigen (KOBASHIGAWA et al., 1995; KATZNELSON et al., 1996; MAGGARD et al., 1998). Weitere Arbeitsgruppen hingegen konnten keine Protektion durch andere Statin nachweisen (WENKE et al., 1997; KASISKE et al., 2001; HOLDAAS et al., 2001). Möglicherweise besteht ein Unterschied zwischen den einzelnen verwendeten Statinen.

Die Haut ist eines der am häufigsten betroffenen Organe der GvHD. Die Hautläsionen ähneln sowohl auf klinischer wie auch auf histologischer Ebene denen, die man beim Lichen planus, dem Lupus erythematoses und der Sklerodermie findet. LFA-1 scheint bei der epidermalen Invasion der T-Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen. In einer Studie konnte an Mäusen die Entwicklung einer kutanen GvHD durch die lokale Gabe von monoklonalen anti-CD4 (L3T4) oder anti-LFA-1 Antikörpern verhindert werden (SHIOHARA et al., 1988).

Harning nutzte ein allogenes Model der akuten letalen GvHD mit C57BL/6 Mäusen als Spender und haploidentischen subletal bestrahlten BDF₁ Mäusen als Empfänger. Die Behandlung der Empfängermäuse mit monoklonalen anti-LFA-1 α (M17/4.2) und anti-Murine Lymphocyte Activation Antigen

(MALA)-2 (YN1/1.7) Antikörpern führte zu einer signifikanten Reduktion der GvHD und einer verlängerten Überlebenszeit. Diese Therapie verminderte das Homing von T-Zellen in die Leber. Damit kam es in ihr zu einer verminderten IL-2 und IL-12 Produktion (HARNING et al., 1991).

Demgegenüber kann jedoch interessanterweise eine Inflamationsreaktion in der Leber im Rahmen der GvHD bei der MHC-inkompatiblem Transplantation in letal bestrahlte ICAM-1^{-/-} Empfänger stattfinden. ICAM-1 scheint hierfür also, im Gegensatz zu LFA-1, nicht zwingend notwendig zu sein. Möglicherweise sind hier ICAM-2 und -3 entscheidend. Obwohl das Homing in die Leber in den Experimenten von Panoskaltis-Mortari nicht beeinträchtigt war und auch die Inzidenz der GvHD nicht beeinflusst wurde, kam es dennoch zu einer deutlichen Reduktion des idiopathischen Pneumonie Syndroms in den ICAM-1 defizienten Empfängern. Die Produktion von inflammatorischen Zytokinen in der Lunge, war hier im Gegensatz zu jenen die systemisch gemessen wurden, stark reduziert (PANOSKALTSIS-MORTARI et al., 2001).

Zur Untersuchung des Einflusses von LFA-1 auf die GvHD steht auch ein humanisierter Antikörper zur Verfügung (WERTHER et al., 1996). Erste mit diesen Antikörpern am Menschen durchgeführte Studien zeigten positive Ergebnisse. In einer Reihe von zehn Patienten mit einer Steroid-resistenten akuten GvHD Grad III - IV untersuchten Stoppa et al. die Wichtigkeit von LFA-1 bei bestehender GvHD. Die Patienten erhielten nicht T-Zell depletiertes allogenes Knochenmark. Zwei der Patienten litten an einer aplastischen Anämie, acht weitere an malignen hämatologischen Erkrankungen. Fünf Transplantate waren voll kompatibel, in drei Fällen stimmte ein HLA-Antigen, in zwei Spender/Empfänger Konstellationen zwei HLA-Antigene nicht überein. Obschon eine GvHD Prophylaxe mit Cyclosporin A und kurzfristig Methotrexattherapie durchgeführt wurde, kam es zu einer akuten GvHD die unter Prednison deutlich fortschritt. Nach Gabe des monoklonalen

Antikörpers 25.3 kam es zu einer Abschwächung der GvHD, jedoch erfuhren sieben von acht Patienten einen Rückfall (STOPPA et al., 1991).

Die in vitro Depletion aller T-Zellen im Spenderknochenmark ist eine effektive Maßnahme um eine GvHD zu verhindern oder deren Schweregrad zu vermindern. Dieses Verfahren geht jedoch auch mit einer höheren Graftverlustrate und einer fehlenden Graft-versus-Tumor Reaktion einher. Da Antikörper gegen CD11a die lytische Aktivität und die Proliferation der T-Zellen sowie die Zytotoxizität der NK-Zellen senken, untersuchte die Arbeitsgruppe um Blazar die Effekte einer selektiven in vitro Depletion LFA-1 positiver zytolytischer T-Zellen, Natural Killer (NK) Zellen und Monozyten während der afferenten Phase der GvHD. Die zweistündige Präinkubation der C57BL/6 Spender Knochenmark- und Milzzellen mit anti-LFA-1-Ricin Toxin A (RTA) in Gegenwart von Ammonium Chlorid führte zu einer signifikanten Verminderung der CTL- und NK-Aktivität und schützte die B10.BR Empfängermause vor der Entwicklung einer GvHD. Demgegenüber profitierten C57BL/6 Empfänger von C3H Knochenmark- und Milzzelltransplantaten nur teilweise von einer anti-LFA-1-RTA Präinkubation der Spenderzellen. Zurückgeführt wurde dies auf eine möglicherweise unterschiedlich starke LFA-1 Expression auf den Zellen der einzelnen Mausstämme (BLAZAR et al., 1991).

Auch im Rahmen von Transplantationen solider Organe, wie Herzen, Leber, Haut oder Inselzellen wurden Antikörper gegen LFA-1 erfolgreich eingesetzt (HARIHARA et al., 1996; GROCHOWIECKI et al., 2000).

So konnte Isobe zeigen, dass die 6-wöchige Behandlung mit Antikörpern gegen LFA-1 und ICAM-1 bei Mäusen zu einer langfristigen Tolerierung allogenen transplanterter Herzen führt. Die Antikörperbehandlung führte zu keiner Leukozytendepletion. Bemerkenswerterweise tolerierten die herztransplan-

tierten Mäuse im Folgenden auch Hauttransplantate des Spenderstammes (ISOBE et al., 1992).

Sowohl Dosis als auch Dauer der Behandlung mit monoklonalen Antikörpern beeinflussen die Überlebenszeit des Transplantates. So konnte Nakakura auch am Mausmodell eine deutlich verlängerte Herztransplantatüberlebenszeit nach 14-tägiger LFA-1 Antikörperbehandlung beobachten. Eine Leukozytendepletion durch die Antikörperbehandlung wurde nicht beschrieben (NAKAKURA et al., 1993; NAKAKURA et al., 1996).

In einer Arbeit an Ratten wurde die 7-11 tägige Behandlung mit Antikörpern gegen LFA-1 und ICAM-1 untersucht. Eine Wirksamkeit der Antikörper bezüglich Langzeitüberleben allogener Herztransplantate konnte nur in Kombination mit Cyclosporin A beobachtet werden. Auch hier ließ sich im Anschluss eine erfolgreiche Hauttransplantation durchführen (KOMORI et al., 1993). Nicht nur Cyclosporin A sondern auch Mycophenolate Mofetil (MMF, RS-61443) scheinen die Wirkung von LFA-1 Antikörpern zu steigern (TAKAZAWA et al., 1996).

Auch Versuche an Primaten lieferten bereits erfolgsversprechende Ergebnisse. Herztransplantierte Rhesus-Affen, die einen humanisierten-anti-CD11a Antikörper erhielten, zeigten eine deutlich verlängertes Transplantatüberleben (POSTON et al., 2000).

Der neu entwickelte humanisierte anti-CD11a Antikörper hu1124 Efalizumab wurde erfolgreich bei Patienten mit Psoriasis angewendet und wird gegenwärtig in großen Studien getestet (GOTTLIEB et al., 2000; PAPP et al., 2001; LEONARDI, 2003).

Bei den bisher hier vorgestellten Studien wurden monoklonale Antikörper verwendet. Zur Durchführung unserer Versuche standen uns CD11a-genmutierte, LFA-1-defiziente, Mäuse zur Verfügung. Auf monoklonale Antikörper konnte so verzichtet werden. Der mögliche Nachteil bei der Verwendung von Knockout Mäusen liegt darin, dass sich bei Fehlen eines Moleküls andere Regelmechanismen ausbilden können, die die Funktion des deletierten Moleküls ganz oder teilweise kompensieren. Dies wäre allerdings auch bei langfristiger Behandlung mit Antikörpern zu erwarten. Andererseits werden aber durch Antikörper vermittelte Nebeneffekte wie Antigen capping, Zellaktivierung in Abwesenheit eines spezifischen Counterparts oder sogar Depletion von Zielzellen durch Apoptose, Komplement oder zellvermittelte Lyse vermieden. Im Hinblick auf die Funktion eines zellulären Moleküls liefern Versuche an Knockout Mäusen wesentlich verlässlichere Daten. Die LFA-1-defizienten Mäuse zeigen in der konventionellen Tierhaltung im Gegensatz zu Patienten mit LAD-Syndrom keine gehäuften bakteriellen Infektionen.

Unsere Untersuchungen mit vollständig MHC-divergenten Spender/Empfänger-konstellationen an Knockout Mäusen erlaubten uns grundlegende Mechanismen der GvHD-Entstehung und Ausprägung zu untersuchen.

Das Standardverfahren der allogenen Transplantation hämatopoetischer Stammzellen im Mausmodell besteht in der Rekonstitution des Empfängers mit Milzzellen des Spenders. Bei diesem Verfahren kommt es rasch zu einer ausgeprägten letalen GvHD. Dieses Vorgehen erschien uns wenig praxisnah. Damit unsere Ergebnisse trotzdem, auch aufgrund der Nähe des murinen Systems zum humanen, Schlussfolgerungen bezüglich der Stammzelltransplantation am Menschen erlauben, erstellten wir neue veränderte Protokolle. Da im Knochenmark nur relativ wenig T-Zellen zu finden sind, führt die MHC-divergente Transplantation von ausschließlich Knochenmarkzellen meist nur zu einer sehr verzögerten und milden GvHD in

Mäusen. Als optimalen Kompromiss sahen wir daher die kombinierte Transplantation von Knochenmark- und wenig Milzzellen an.

In unseren Versuchen wurden einzeln, oder kombiniert Milz- und Knochenmarkzellen von CD11a homozygot und heterozygot genmutierten C57BL/6 Mäusen (MHC-Genotyp H-2^b) in letal bestrahlte BALB/c (MHC-Genotyp H-2^d) und BALB.B (MHC-Genotyp H-2^b) Mäuse transplantiert. Untersucht wurde damit sowohl eine Major Histocompatibility Complex (MHC) als auch eine minor Histocompatibility Complex (miHC) vermittelte Immunaantwort. Unabhängig davon, ob die Spender-Leukozyten LFA-1 exprimierten oder nicht, kam es bei hundertprozentigem Engraftment zur Ausbildung einer GvHD. Es zeigte sich in keiner Versuchsreihe ein signifikanter Unterschied bezüglich der Überlebenszeit zwischen Wildtyp und LFA-1-defizienten Mäusen.

Insbesondere die Ergebnisse der allogenen Milzzelltransplantation sind im Einklang mit den Antikörperstudien von Blazer. Blazar fand jedoch einen synergistischen Effekt von LFA-1 und B7 bei der Entstehung und Ausprägung einer GvHD. Er verwendete mit der Kombination aus anti-CD11a Antikörpern und CTLA-4-Ig eine Therapie welche zu einem guten Langzeitüberleben der über MHC-Grenzen transplantierten Tiere führte (BLAZAR et al., 1995).

Auch Antigen präsentierende Zellen des Empfängers (APC) exprimieren LFA-1. Um das Fehlen von LFA-1 auf den Zellen des Empfängerorganismus zu untersuchen wurden daher CD11a-genmutierte oder Wildtyp C57BL/6 Mäuse als Empfänger und BALB/c Mäuse als Spender herangezogen. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Entwicklung einer GvHD und der Überlebenszeit. Das Engraftment war in allen Fällen vollständig.

Die von uns durchgeführten in vivo Versuche konnten damit keine Unterschiede zwischen LFA-1-defizienten/CD11a-genmutierten und Wildtyp Mäusen bezüglich Überlebenszeit oder Schweregrad der GvHD aufzeigen. Die systemische T-Zellaktivierung scheint damit unabhängig von LFA-1 stattzufinden. Das Ergebnis, dass sich eine GvHD auch ohne Vorhandensein von LFA-1 entwickeln kann, heißt nicht unbedingt, dass LFA-1 keine Rolle bei der Entstehung der akuten GvHD spielt. Möglicherweise wird das Fehlen von LFA-1 durch andere kostimulatorische Moleküle kompensiert. Alternativ sind auch überlappende Funktionen mehrerer beteiligter Moleküle möglich. Obschon in vivo gezeigt werden konnte, dass nach Stimulation mit TNF- α die Adhäsion der Leukozyten an der Endothelwand deutlich vermindert ist, scheint insbesondere die Adhäsion naiver T-Zellen in der Milz unabhängig von Adhäsionsmolekülen zu geschehen (THORLACIUS et al., 2000). Effektive Zell-Zellinteraktionen finden somit auch in Abwesenheit von LFA-1 statt. Es gibt desweiteren Hinweise, dass sich Art und Ausmaß der Integrinexpression nach der Transplantation im Verlauf ändern und ihre Rolle zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedlich ist (WYSOCKI et al., 2005).

LFA-1 wurde als Adhäsionsmolekül auch bezüglich seiner Bedeutung im Rahmen eines erfolgreichen Engraftments diskutiert (GUNJI et al., 1992; MOHLE et al., 1997; SCHMITS et al., 1997; PELED et al., 2000; KOLLET et al., 2001). Unsere Versuche gaben uns die Möglichkeit eventuelle Engraftmentdefekte in den genmutierten Mäusen aufzudecken. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten bei allen untersuchten Tieren ein komplettes Engraftment mit hundertprozentigem Spender-chimerismus.

Zusammenfassend sind weitere Studien, welche den Einfluss von LFA-1 in Kombination mit anderen Adhäsionsmolekülen oder potentiellen kostimulatorischen Molekülen untersuchen, nötig. Wahrscheinlich werden

zukünftige effektive therapeutische Ansätze zur Vermeidung oder Verminderung einer GvHD darauf zurückgreifen wenigstens initial mehrere kostimulatorische Wege gleichzeitig zu blockieren. Daneben sollte es aber zu keiner Zunahme der Infektanfälligkeit oder Rate von Virenreaktivierungen kommen. Unsere Beobachtungen erlauben keinen Rückschluss auf eine Verminderung der natürlichen Immunantwort in LFA-1-defizienten Mäusen. Gleiches sollte für die Anwendung von monoklonalen LFA-1 Antikörpern oder LFA-1 spezifischen kostimulatorischen Molekülen gelten. Somit bleibt LFA-1 ein interessanter Kandidat zur Immunmodulation im Rahmen allogener Transplantationen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abraham C, Griffith J, Miller J (1999) The dependence for leukocyte function-associated antigen-1/ICAM-1 interactions in T cell activation cannot be overcome by expression of high density TCR ligand. *J Immunol* 162:4399-4405
2. Abraham C, Miller J (2001) Molecular mechanisms of IL-2 gene regulation following costimulation through LFA-1. *J Immunol* 167:5193-5201
3. Ahmed R, Butler LD, Bhatti L (1988) T4+ T helper cell function in vivo: differential requirement for induction of antiviral cytotoxic T-cell and antibody responses. *J Virol* 62:2102-2106
4. Altmann DM, Hogg N, Trowsdale J, Wilkinson D (1989) Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* 338:512-514
5. Anasetti C, Martin PJ, Storb R, Appelbaum FR, Beatty PG, Calori E, Davis J, Doney K, Reichert T, Stewart P, et al (1991) Prophylaxis of graft-versus-host disease by administration of the murine anti-IL-2 receptor antibody 2A3. *Bone Marrow Transplant* 7:375-381
6. Anderson BE, McNiff JM, Matte C, Athanasiadis I, Shlomchik WD, Shlomchik MJ (2004) Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104:1565-1573
7. Anderson DC, Schmalsteig FC, Finegold MJ, Hughes BJ, Rothlein R, Miller LJ, Kohl S, Tosi MF, Jacobs RL, Waldrop TC (1985) The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis* 152 :668-689
8. Andolina M, Rabusin M, Maximova N (2000) Etanercept in graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 26:929a
9. Antin JH, Bierer BE, Smith BR, Ferrara J, Guinan EC, Sieff C, Golan DE, Macklis RM, Tarbell NJ, Lynch E, et al (1991) Selective depletion of bone marrow T lymphocytes with anti-CD5 monoclonal antibodies: effective

prophylaxis for graft-versus-host disease in patients with hematologic malignancies. *Blood* 78:2139-2149

10. Antin JH, Weinstein HJ, Guinan EC, McCarthy P, Bierer BE, Gilliland DG, Parsons SK, Ballen KK, Rimm IJ, Falzarano G, et al (1994) Recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in the treatment of steroid-resistant graft-versus-host disease. *Blood* 84:1342-1348
11. Appelbaum FR, Herzig GP, Zirgler JL, Graw RG, Levine AS, Deisseroth AB (1978) Successful Engraftment of Cryopreserved Autologous Bone Marrow in Patients With Malignant Lymphoma. *Blood* 52:85-95
12. Arai S, Margolis J, Zahurak M, Anders V, Vogelsang GB (2002) Poor outcome in steroid-refractory graft-versus-host disease with antithymocyte globulin treatment. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:155-160
13. Arroyo AG, Campanero MR, Sanchez-Mateos P, Zapata JM, Ursa MA, del Pozo MA, Sanchez-Madrid F (1994) Induction of tyrosine phosphorylation during ICAM-3 and LFA-1-mediated intercellular adhesion, and its regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. *J Cell Biol* 126:1277-1286
14. Arstila TP, Casrouge A, Baron V, Even J, Kanellopoulos J, Kourilsky P (1999) A direct Estimate of the human $\alpha\beta$ T Cell Receptor Diversity. *Science* 286:958-961
15. Aversa F, Terenzi A, Felicini R (2002) Haploidentical stem cell transplantation for acute leukemia. *Int J Hematol* 76(suppl 1):165-168
16. Bachmann MF, McKall-Faienza K, Schmits R, Bouchard D, Beach J, Speiser DE, Mak TW, Ohashi PS (1997) Distinct Roles for LFA-1 and CD28 during Activation of Naive T Cells: Adhesion versus Costimulation. *Immunity* 7:549-557
17. Bancherea J, Steinman RM (1998) Dendritic Cells and the Controll of Immunity. *Nature* 392:245-252
18. Barret AJ, Mavroudis D, Tisdale J, Molldrem J, Clave E, Dunbar C, Cottler-Fox M, Phang S, Carter C, Okunieff P, Young NS, Read EJ: T cell-depleted bone marrow transplantation and delayed T cell addback to

control acute GVHD and conserve a graft-versus-leukemia effect. Bone Marrow Transplant 21:543-551

19. Beatty PG, Clift RA, Mickelson EM, Nisperos BB, Flournoy N, Martin PJ, Sanders JE, Stewart P, Buckner CD, Storb R, Thomas ED, Hansen JA (1985) Marrow Transplantation from related donors other than HLA-Identical Siblings. N Eng J Med 313:765-771
20. Beatty PG, Dahlberg S, Mickelson EM, Nisperos B, Opelz G, Martin PJ, HANSEN JA (1988) Probability of Finding HLA-Matched Unrelated Marrow Donors. Transplantation 45:714-718
21. Benito AI, Furlong T, Martin PJ, Anasetti C, Appelbaum FR, Doney K, Nash RA, Papayannopoulou T, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon R, Deeg HJ (2001) Sirolimus (rapamycin) for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. Transplantation 72:1924-1929
22. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. Nature 393:478-480
23. Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, Nelson RD, Berg EL, Erlandsen SL, Butcher EC (1995) Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. Cell 80:413-422
24. Billingham R, Brent L (1959) Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease. Philos Trans R Soc Lond 242:439-477
25. Billingham RE (1967) The Biology of Graft-versus-Host Reactions. Harvey Lect 62:21-78
26. Binnerts ME, Van Kooyk Y, Simmons DL, Figdor CG (1994) Distinct binding of T lymphocytes to ICAM-1, -2 or -3 upon activation of LFA-1. Eur J Immunol 24:2155-2160
27. Blaise D, Olive D, Hirn M, Viens P, Lafage M, Attal M, Stoppa AM, Gabert J, Gastaut JA, Camerlo J, et al (1991) Prevention of acute GVHD by in vivo use of anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody (33B3.1): a feasibility trial in 15 patients. Bone Marrow Transplant 8:105-111

28. Blazar BR, Carroll SF, Valleria DA (1991) Prevention of Murine Graft-Versus-Host Disease and Bone Marrow Alloengraftment Across the Major Histocompatibility Barrier After donor Graft Preincubation With Anti-LFA1 Immunotoxin. *Blood* 78:3093-3102
29. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Gray GS, Valleria DA (1995) Coblockade of the LFA1:ICAM and CD28/CTLA4:B7 pathways is a highly effective means of preventing acute lethal graft-versus-host disease induced by fully major histocompatibility complex-disparate donor grafts. *Blood* 85:2607-2618
30. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Buhlman J, Xu J, Flavell RA, Korngold R, Noelle R, Valleria DA (1997) Blockade of CD40 Ligand-CD40 Interaction Impairs CD4⁺ T Cell-Mediated Alloreactivity by Inhibiting Mature Donor T Cell Expansion and Function after Bone Marrow Transplantation. *J Immunol* 158:29-39
31. Blazar BR, Taylor PA, Boyer MW, Panoskaltsis-Mortari A, Allison JP, Valleria DA (1997) CD28/B7 Interactions Are Required for Sustaining the Graft-Versus-Leukemia Effect of Delayed Post-Bone Marrow Transplantation Splenocyte Infusion in Murine Recipients of Myeloid or Lymphoid Leukemia Cells. *J Immunol* 159: 3460-3473
32. Blazar BR, Taylor PA, Panoskaltsis-Mortari A, Sharpe AH, Valleria DA (1999) Opposing Roles of CD28:B7 and CTLA-4:B7 Pathways in Regulating In Vivo Alloresponses in Murine Recipients of MHC Disparate T Cells. *J Immuno* 162:6368-6377
33. Blazar BR, Taylor PA (2005) Regulatory T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:46-49
34. Bluestone JA (1996) Costimulation and its role in organ transplantation. *Clin Transplant* 10:104-109
35. Bolanos-Meade J, Jacobson D, Margolis J (2002) Pentostatin in steroid refractory acute graft versus host disease. *Blood* 100:420a
36. Bonini C, Ferrari G, Verzeletti S, Servida P, Zappone E, Ruggieri L, Ponzoni M, Rossini S, Mavilio F, Traversari C, Bordignon C (1997) HSV-TK Gene Transfer into Donor Lymphocytes for Control of Allogeneic Graft-Versus-Leukemia. *Science* 276:1719-1724

37. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, Arny M, Thomas L, Boyse EA (1989) Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3828-3832
38. Bruner RJ, Farag SS (2003) Monoclonal Antibodies for the Prevention and Treatment of Graft-Versus-Host Disease. *Semin Oncol* 30:509-519
39. Buggins AGS, FISHLOCK K, WESTWOOD NB (2002) Peripheral blood cells with the phenotype and function of myeloid dendritic cells express CD52 and are depleted during therapy with CAMPATH-1H. *Br J Haematol* 117:53
40. Burk RD, Poller DN, Spitzer TR, Sykes M, Childs R, Barret AJ, Linehan WM (2001) Treatment of Renal-Cell Cancer by Transplantation of Allogeneic Stem Cells. *N Engl J Med* 344:137-138
41. Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte Homing and Homeostasis. *Science* 272:60-66
42. Cahn JY, Bordigoni P, Tiberghien P, Milpied N, Brion A, Widjenes J, Lioure B, Michel G, Burdach S, Kolb HJ, et al (1995) Treatment of acute graft-versus-host disease with methylprednisolone and cyclosporine with or without an anti-interleukin-2 receptor monoclonal antibody. A multicenter phase III study. *Transplantation* 60:939-942
43. Cai Z, Kishimoto H, Brunmark A, Jackson MR, Peterson PA, Sprent J (1997) Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8+ T cells. *J Exp Med* 185:641-651
44. Camitta BM, Thomas ED, Nathan DG, Gale RP, Kopecky KJ, Rapoport JM, Santos G, Gordon-Smith EC, Storb R (1979) A Prospective Study of Androgens and Bone Marrow Transplantation for Treatment of Severe Aplastic Anemia. *Blood* 53:504-514
45. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC (1998) Chemokines and the arrest of lymphocytes rolling under flow conditions. *Science*, 279:381-384
46. Canninga-van Dijk MR, van der Straaten HM, Fijnheer R, Sanders CJ, van den Tweel JG, Verdonck LF (2004) Anti-CD20 monoclonal antibody

treatment in 6 patients with therapy-refractory chronic graft-versus-host disease. *Blood* 104:2603-2606

47. Carlos TM, Harlan JM (1994) Leukocyte-endothelial Adhesion Molecules. *Blood* 84:2068-2101
48. Carman CV, Springer TA (2003) Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Curr Opin Cell Biol* 15:547-556
49. Carpenter PA, Appelbaum FR, Corey L, Deeg HJ, Doney K, Gooley T, Krueger J, Martin P, Pavlovic S, Sanders J, Slattery J, Levitt D, Storb R, Woolfrey A, Anasetti C (2002) A humanized non-FcR-binding anti-CD3 antibody, visilizumab, for treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease. *Blood* 99:2712-2719
50. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9:10-16
51. Chakrabarti S, MacDonald D, Hale G, Holder K, Turner V, Czarnecka H, Thompson J, Fegan C, Waldmann H, Milligan DW (2003) T-cell depletion with Campath-1H "in the bag" for matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is associated with reduced graft-versus-host disease, rapid immune constitution and improved survival. *Br J Haematol* 121:109-118
52. Chao N, Snyder D, Jain M (1999) Equivalence of two effective GVHD prophylaxis regimens: Results of a prospective blinded randomized trial. *Blood* 94:2957a
53. Chan GW, Gorgun G, Miller KB, Foss FM (2003) Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:170-176
54. Chiang KY, Abhyankar S, Bridges K, Godder K, Henslee-Downey JP (2002) Recombinant human tumor necrosis factor receptor fusion protein as complementary treatment for chronic graft-versus-host disease. *Transplantation* 73:665-667
55. Constantin G, Majeed M, Giagulli C, Piccio L, Kim JY, Butcher EC, Laudanna C (2000) Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity

and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13:759-769

56. Cooke KR, Gerbitz A, Crawford JM, Teshima T, Hill GR, Tesolin A, Rossignol DP, Ferrara JL (2001) LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 107:1581-1589
57. Couriel DR, Saliba RM, Giralt S, Khouri I, Andersson B, de Lima M, Hosing C, Anderlini P, Donato M, Cleary K, Gajewski J, Neumann J, Ippoliti C, Rondon G, Cohen A, Champlin R (2004) Acute and chronic graft-versus-host disease after ablative and nonmyeloablative conditioning for allogeneic hematopoietic transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:178-185
58. Couriel D, Saliba R, Hicks K, Ippoliti C, de Lima M, Hosing C, Khouri I, Andersson B, Gajewski J, Donato M, Anderlini P, Kontoyiannis DP, Cohen A, Martin T, Giralt S, Champlin R (2004) Tumor necrosis factor-alpha blockade for the treatment of acute GVHD. *Blood* 104:649-654
59. Cyster JG (1999) Chemokines and Cell Migration in secondary lymphoid organs. *Science* 286:2098-2102
60. Dall'Amico R, Messina C (2002) Extracorporeal photochemotherapy for the treatment of graft-versus-host disease. *Ther Apher* 6:296-304
61. Davignon D, Martz E, Reynolds T, Kurzinger K, Springer TA (1981) Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J Immunol* 127:590-595
62. Debenedette MA, Shahinian A, Mak TW, Watts TH (1997) Costimulation of CD28⁺ T Lymphocytes by 4-1BB Ligand. *J Immunol* 158:551-559
63. Deeg HJ, Storb R (1984) Graft-versus-host disease: pathophysiological and clinical aspects. *Annu Rev Med.* 35:11-24
64. Deeg HJ, Blazar BR, Bolwell BJ, Long GD, Schuening F, Cunningham J, Rifkin RM, Abhyankar S, Briggs AD, Burt R, Lipani J, Roskos LK, White JM, Havrilla N, Schwab G, Heslop HE (2001) Treatment of steroid-

refractory acute graft-versus-host disease with anti-CD147 monoclonal antibody ABX-CBL. *Blood* 98:2052-2058

65. Denton MD, Magee CC, Sayegh MH (1999) Immunosuppressive strategies in transplantation. *Lancet* 353:1083-1091
66. DeSmedt T, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, De Baetselier P, Urbain J, Leo O, Moser M (1996) Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med* 184:1413-1424
67. Devetten MP, Vose JM (2004) Graft-versus-host disease: how to translate new insights into new therapeutic strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:815-825
68. De Witte T, Hoogenhout J, de Pauw B, Holdrinet R, Janssen J, Wessels J, van Daal W, Hustinx T, Haanen C (1986) Depletion of donor lymphocytes by counterflow centrifugation successfully prevents acute graft-versus-host disease in matched allogeneic marrow transplantation. *Blood* 67:1302-1308
69. Dicke KA, McCredie KB, Spitzer G, Zander A, Peters L, Verma DS, Stewart D, Keating M, Stevens EE (1978) Autologous Bone Marrow Transplantation in Patients with Adult Acute Leukemia in Relapse. *Transplantation* 26:169-173
70. Doney KC, Weiden PL, Storb R, Thomas ED (1981) Failure of early administration of antithymocyte globulin to lessen graft-versus-host disease in human allogeneic marrow transplant recipients. *Transplantation* 31:141-143
71. Dubey C, Croft M, Swain SL (1995) Costimulatory requirements of naive CD4+ T cells. ICAM-1 or B7-1 can costimulate naive CD4 T cell activation but both are required for optimum response. *J Immunol* 155:45-57
72. Duffner U, Lu B, Hildebrandt GC, Teshima T, Williams DL, Reddy P, Ordemann R, Clouthier SG, Lowler K, Liu C, Gerard C, Cooke KR, Ferrara JL (2003) Role of CXCR3-induced donor T-cell migration in acute GVHD. *Exp Hematol* 31:897-902
73. Duggan P, Booth K, Chaudhry A, Stewart D, Ruether JD, Gluck S, Morris D, Brown CB, Herbut B, Coppes M, Anderson R, Wolff J, Egeler M, Desai

- S, Turner AR, Larratt L, Gyonyor E, Russell JA; Alberta Blood and Bone Marrow Transplant Program (2002) Unrelated donor BMT recipients given pretransplant low-dose antithymocyte globulin have outcomes equivalent to matched sibling BMT: a matched pair analysis. *Bone Marrow Transplant* 30:681-686
74. Dustin ML, Springer TA (1989) T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* 341:619-624
 75. Ebnet K, Suzuki A, Ohno S, Vestweber D (2004) Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? *J Cell Sci* 117:19-29
 76. Epstein RB, Storb R, Clift A, Thomas ED (1969) Transplantation of Stored Allogeneic Bone Marrow in Dogs Selected by Histocompatibility Typing. *Transplantation* 8:496-501
 77. Filipovich AH, McGlave PB, Ramsay NK, Goldstein G, Warkentin PI, Kesey JH (1982) Pretreatment of donor bone marrow with monoclonal antibody OKT3 for prevention of acute graft-versus-host disease in allogeneic histocompatible bone-marrow transplantation. *Lancet* 1:1266-1269
 78. Fischer A, Lisowska-Grospierre B, Anderson DC, Springer TA (1988) Leukocyte adhesion deficiency: molecular basis and functional consequences. *Immunodef Rev* 1:39-54
 79. Ford CE, Hamerton JL, Barnes DWH, Loutit JF (1956) Cytological Identification of Radiation-Chimaeras. *Nature* 177:452-454
 80. Frenette PS (2001) Locking a leukocyte integrin with statins. *N Engl J Med* 345:1419-1421
 81. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema G, van Kooyk Y, Figdor CG (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100:575-585
 82. Gerli R, Paolucci C, Gresele P, Bistoni O, Fiorucci S, Muscat C, Belia S, Bertotto A, Costantini V (1998) Salicylates inhibit adhesion and

transmigration of T lymphocytes by preventing integrin activation induced by contact with endothelial cells. *Blood* 92:2389-2398

83. Germain RN, Stefanova I (1999) The Dynamics of T Cell Receptor Signaling: Complex Orchestration and the Key Roles of Tempo and Cooperation. *Annu Rev Immunol* 17:467-522
84. Gianni AM, Siena S, Bregni M, Tarella C, Stern AC, Pileri A, Bonadonna G (1989) Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor to Harvest Circulating Haemopoietic Stem Cells for Autotransplantation. *Lancet* 2:580-584
85. Gingrich RD, Ginder GD, Goeken NE, Howe CWS, Wen BC, Hussey DH, Fyfe MA (1988) Allogeneic Marrow Grafting With Partially Mismatched, Unrelated Marrow Donors. *Blood* 71:1375-1381
86. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, Cooper S, English D, Kurtzberg J, Bard J, Boyse EA (1989) Hematopoietic Reconstitution in a Patient with Fanconi's Anemia by Means of Umbilical-Cord Blood from an HLA-Identical Sibling. *N Eng J Med* 321:1174-1178
87. Goldberg JD, Jacobsohn DA, Margolis J, Chen AR, Anders V, Phelps M, Vogelsang GB (2003) Pentostatin for the treatment of chronic graft-versus-host disease in children. *J Pediatr Hematol Oncol* 25:584-588
88. Gottlieb A, Krueger JG, Bright R, Ling M, Lebwohl M, Kang S, Feldman S, Spellman M, Wittkowski K, Ochs HD, Jardieu P, Bauer R, White M, Dedrick R, Garovoy M (2000) Effects of administration of a single dose of a humanized monoclonal antibody to CD11a on the immunobiology and clinical activity of psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 42:428-435
89. Gowans JL (1962) The Fate of Parental Strain Small Lymphocytes in F₁ Hybrid Rats. *Ann N Y Acad Sci* 99:432-455
90. Greinix HT, Volc-Platzer B, Kalhs P, Fischer G, Rosenmayr A, Keil F, Honigsmann H, Knobler RM (2000) Extracorporeal photochemotherapy in the treatment of severe steroid-refractory acute graft-versus-host disease: a pilot study. *Blood* 96:2426-2431

91. Gribben JG, Guinan EC, Boussiotis VA, Ke XY, Linsley L, Sieff C, Gray GS, Freeman GJ, Nadler LM (1996) Complete blockade of B7 family-mediated costimulation is necessary to induce human alloantigen-specific anergy: a method to ameliorate graft-versus-host disease and extend the donor pool. *Blood* 87:4887-4893
92. Grochowicki T, Gotoh M, Dono K, Takeda Y, Sakon M, Yagita H, Okumura K, Miyasaka M, Monden M (2000) Induction of unresponsiveness to islet xenograft by MMC treatment of graft and blockage of LFA-1/ICAM-1 pathway. *Transplantation* 69:1567-1571
93. Guinan EC, Boussiotis VA, Neuberg D, Brennan LL, Hirano N, Nadler LM, Gribben JG (1999) Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts. *N Engl J Med* 340:1704-1714
94. Gunji Y, Nakamura M, Hagiwara T, Hayakawa K, Matsushita H, Osawa H, Nagayoshi K, Nakauchi H, Yanagisawa M, Miura Y (1992) Expression and function of adhesion molecules on human hematopoietic stem cells: CD34+ LFA-1- cells are more primitive than CD34+ LFA-1+ cells. *Blood* 80:429-436
95. Hale G, Zhang MJ, Bunjes D, Prentice HG, Spence D, Horowitz MM, Barrett AJ, Waldmann H (1998) Improving the Outcome of Bone Marrow Transplantation by Using CD52 Monoclonal Antibodies to Prevent Graft-Versus-Host Disease and Graft Rejection. *Blood* 92:4581-4590
96. Hansen JA, Clift RA, Thomas ED, Buckner CD, Storb R, Giblett ER (1980) Transplantation of Marrow from an Unrelated Donor to a Patient with Acute Leukemia. *N Eng J Med* 303:565-567
97. Hara T, Fu SM, Hansen JA (1985) Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med* 161:1513-1524
98. Harihara Y, Sugawara Y, Inoue K, Kubota K, Bandai Y, Makuuchi M, Miyasaka M (1996) Dose dependent immunosuppressive effects of antibodies to ICAM-1 and LFA-1 on hepatic allografts. *Transplant Proc* 28:1794-1795

99. Harning R, Pelletier J, Lubbe K, Takei F, Merluzzi VJ (1991) Reduction in the Severity of Graft-versus-Host Disease and Increased Survival in Allogeneic Mice by Treatment with Monoclonal Antibodies to Cell Adhesion Antigens LFA-1 and MALA-2. *Transplantation* 52:842-845
100. Hattori K, Hirano T, Miyajima H, Yamakawa N, Tateno M, Oshimi K, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K (1998) Differential effects of anti-Fas ligand and anti-tumor necrosis factor alpha antibodies on acute graft-versus-host disease pathologies. *Blood* 91:4051-4055
101. Hermand P, Huet M, Callebaut I, Gane P, Ihanus E, Gahmberg CG, Cartron JP, Bailly P (2000) Binding sites of leukocyte beta 2 integrins (LFA-1, Mac-1) on the human ICAM-4/LW blood group protein. *Biol Chem* 275:26002-26010
102. Herve P, Wijdenes J, Bergerat JP, Bordigoni P, Milpied N, Cahn JY, Clement C, Beliard R, Morel-Fournier B, Racadot E, Troussard X, Benz-LeMoine E, Gaud C, LeGros M, Attal M, Kloft M, Peters A (1990) Treatment of Corticosteroid Resistant Acute Graft-Versus-Host Disease by In Vivo Administration of Anti-Interleukin-2 Receptor Monoclonal Antibody (B-B10). *Blood* 75:1017-1023
103. Hess AD, Fischer AC (1989) Immune Mechanisms in Cyclosporine-Induced Syngeneic Graft-Versus-Host Disease. *Transplantation* 48:895-900
104. Hill GR, Cooke KR, Teshima T, Crawford JM, Keith JC Jr, Brinson YS, Bungard D, Ferrara JL. (1998) Interleukin-11 promotes T cell polarization and prevents acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest* 102:115-123
105. Ho V, Zariw D, Neuberg D (2002) Safety and efficacy of denileukin difitox (ONTAK) in patients with steroid refractory graft-versus-host disease (GVHD) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). *Blood* 100:423a
106. Hogg N, Henderson R, Leitinger B, McDowall A, Porter J, Stanley P (2002) Mechanisms contributing to the activity of integrins on leukocytes. *Immunol Rev* 186:164-171

107. Hogg N, Laschinger M, Giles K, Alison McDowall (2003) T-cell integrins: more than just sticking points. *J Cell Sci* 116:4695-4705
108. Holdaas H, Jardine AG, Wheeler DC, Brekke IB, Conlon PJ, Fellstrom B, Hammad A, Holme I, Isoniemi H, Moore R, Rowe PA, Sweny P, Talbot DA, Wadstrom J, Ostraat O (2001) Effect of fluvastatin on acute renal allograft rejection: a randomized multicenter trial. *Kidney Int* 60:1990-1997
109. Holler E, Kolb HJ, Mittermuller J, Kaul M, Ledderose G, Duell T, Seeber B, Schleuning M, Hintermeier-Knabe R, Ertl B, et al (1995) Modulation of acute graft-versus-host-disease after allogeneic bone marrow transplantation by tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) release in the course of pretransplant conditioning: role of conditioning regimens and prophylactic application of a monoclonal antibody neutralizing human TNF alpha (MAK 195F). *Blood* 86:890-899
110. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, Rozman C, Speck B, Truitt RL, Zwaan FE, Bortin MM (1990) Graft-Versus-Leukemia Reactions After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 75:555-562
111. Hows J, Bradley BA, Gore S, Downie T, Howard M, Gluckman E (1993) Prospective evaluation of unrelated donor bone marrow transplantation. The International Marrow Unrelated Search and Transplant (IMUST) Study. *Bone Marrow Transplant* 12:371-380
112. Hynes RO (1987) Integrins: A Family of Cell Surface Receptors. *Cell* 48:549-554
113. Inaba K, Witmer MD, Steinman RM (1984) Clustering of dendritic cells, helper T lymphocytes, and histocompatible B cells during primary antibody responses in vitro. *J Exp Med* 160:858-876
114. Isobe M, Yagita H, Okumura K, Ihara A (1992) Specific acceptance of cardiac allograft after treatment with antibodies to ICAM-1 and LFA-1. *Science* 255:1125-1127
115. Jacobson D, Margolis J, Chen A (2001) Pentostatin: a promising treatment for refractory chronic GVHD. *Blood* 98:399a

116. Jacobson LO, Marks EK, Robeson BS, Gaston E, Zirkle RE (1949) The Effect of Spleen Protection on Mortality following X-Irradiation. *J Lab Clin Med* 34:1538-1543
117. Jagannath S, Dicke KA, Armitage JO, Cabanillas FF, Horwitz LJ, Vellekoop L, Zander AR, Spitzer G (1986) High-Dose Cyclophosphamide, Carmustine, and Etoposide and Autologous Bone Marrow Transplantation for Relapsed Hodgkin's Disease. *Ann Intern Med* 104:163-168
118. Jaksch M, Mattsson J (2005) The pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Scand J Immunol* 61:398-409
119. Johnson-Leger C, Imhof BA (2003) Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell Tissue Res* 314:93-105
120. Johnston LJ, Brown J, Shizuru JA, Stockerl-Goldstein KE, Stuart MJ, Blume KG, Negrin RS, Chao NJ (2005) Rapamycin (sirolimus) for treatment of chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 11:47-55
121. Jolivet J, Cowan KH, Curt GA, Clendeninn NJ, Chabner BA (1983) The Pharmacology and Clinical Use of Methotrexate. *N Eng J Med* 309:1094-1104
122. Kahan BD, Julian BA, Pescovitz MD, Vanrenterghem Y, Neylan J (1999) Sirolimus reduces the incidence of acute rejection episodes despite lower cyclosporine doses in caucasian recipients of mismatched primary renal allografts: a phase II trial. Rapamune Study Group. *Transplantation* 68:1526-1532
123. Kansas GS (1996) Selectins and their Ligands: current Concepts and Controversies. *Blood* 88:3259-3287
124. Kasiske BL, Heim-Duthoy KL, Singer GG, Watschinger B, Germain MJ, Bastani B (2001) The effects of lipid-lowering agents on acute renal allograft rejection. *Transplantation* 72:223-227
125. Katagiri K, Hattori M, Minato N, Irie S, Takatsu K, Kinashi T (2000) Rap1 is a potent activation signal for leukocyte function-associated antigen 1 distinct from protein kinase C and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Mol Cell Biol* 20:1956-1969

126. Katznelson S, Wilkinson AH, Kobashigawa JA, Wang XM, Chia D, Ozawa M, Zhong HP, Hirata M, Cohen AH, Teraski PI (1996) The effect of pravastatin on acute rejection after kidney transplantation--a pilot study. *Transplantation* 61:1469-1474
127. Kawai K, Shahinian A, Mak TW, Ohashi PS (1996) Skin allograft rejection in CD28-deficient mice. *Transplantation* 61:352-355
128. Keene JA, Forman J (1982) Helper activity is required for the in vivo generation of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 155:768-782
129. Kennedy MK, Mohler KM, Shanebeck KD, Baum PR, Picha KS, Otten-Evans CA, Janeway Jr, Grabstein KH (1994) Induction of B cell costimulatory function by recombinant murine CD40 ligand. *Eur J Immunol* 24:116-123
130. Kernan NA, Collinns NH, Juliano L, Cartagena T, Dupont B, O'Reilly RJ (1986) Clonable T Lymphocytes in T Cell-Depleted Bone Marrow Transplants Correlate With Development of Graft-v-Host Disease. *Blood* 68:770-773
131. Kessinger A, Armitage JO, Landmark JD, Smith DM, Weisenburger DD (1988) Autologous Peripheral Hematopoietic Stem Cell Transplantation Restores Hematopoietic Function Following Marrow Ablative Therapy. *Blood* 71:723-727
132. Kiehl MG, Schafer-Eckart K, Kroger M, Bornhauser M, Basara N, Blau IW, Kienast J, Fauser AA, Ehninger G, Armstrong VW, Shipkova M (2002) Mycophenolate mofetil for the prophylaxis of acute graft-versus-host disease in stem cell transplant recipients. *Transplant Proc* 34:2922-2924
133. Kim CH, Broxmeyer HE (1999) Chemokines: Signal Lamps for Trafficking of T and B Cells for Development and Effector Function. *J Keukoc Biol* 65:6-15
134. Kobashigawa JA, Katznelson S, Laks H, Johnson JA, Yeatman L, Wang XM, Chia D, Terasaki PI, Sabad A, Cogert GA (1995) Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 333:621-627
135. Kollet O, Spiegel A, Peled A, Petit I, Byk T, HersHKoviz R, Guetta E, Barkai G, Nagler A, Lapidot T (2001) Rapid and efficient homing of human

- CD34(+)CD38(-/low)CXCR4(+) stem and progenitor cells to the bone marrow and spleen of NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Blood* 97:3283-3291
136. Komori A, Nagata M, Ochiai T, Nakajima K, Hori S, Asano T, Isono K, Tamatani T, Miyasaka M (1993) Role of ICAM-1 and LFA-1 in cardiac allograft rejection of the rat. *Transplant Proc* 25:831-832
 137. Koopman G, Keehnen RMJ, Lindhout E, Newman W, Shimizu Y, Van Seventer GA, De Groot C, Pals ST (1994) Adhesion Through the LFA-1 (CD11a/CD18)-ICAM-1 (CD54) and the VLA-4 (CD49d)-VCAM-1 (CD106) Pathways Prevents Apoptosis of Germinal Center B Cells. *J Immunol* 152:3760-3767
 138. Kopp E, Ghosh S (1994) Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 265:956-959
 139. Krawczyk C, Oliveira-dos-Santos A, Sasaki T, Griffiths E, Ohashi PS, Snapper S, Alt F, Penninger JM (2002) Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16:331-343
 140. Krenger W, Hill GR, Ferrara JLM (1997) Cytokine Cascades in Acute Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 64:553-558
 141. Krensky AM, Weiss A, Crabtree G, Davis MM, Parham P (1990) T-Lymphocyte Antigen Interactions in Transplant Rejection. *N Eng J Med* 322:510-517
 142. Lafferty KJ, Woolnough J (1977) The origin and mechanism of the allograft reaction. *Immunol Rev* 35:231-262
 143. Lanier LL (1997) Natural killer cells: from no receptors to too many. *Immunity* 6:371-378
 144. Lawrence MB, Springer TA (1991) Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and Prerequisite for Adhesion through Integrins. *Cell* 65:859-873

145. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363:1439-1441
146. Lee SJ, Zahrieh D, Agura E, MacMillan ML, Maziarz RT, McCarthy PL Jr, Ho VT, Cutler C, Alyea EP, Antin JH, Soiffer RJ (2004) Effect of up-front daclizumab when combined with steroids for the treatment of acute graft-versus-host disease: results of a randomized trial. *Blood* 104:1559-1564
147. Lee SJ (2005) New approaches for preventing and treating chronic graft-versus-host disease. *Blood* 105:4200-4206
148. Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlethwaite JR, Montag A, Brady W, Gibson MG, Linsley PS, Bluestone JA (1992) Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4lg. *Science* 257:789-792
149. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233-258
150. Leonardi CL (2003) Efalizumab: An overview. *J Am Acad Dermatol* 49:S98-104
151. Lindbom L, Xie X, Raud J, Hedqvist P (1992) Chemoattractant-induced firm adhesion of leukocytes to vascular endothelium in vivo is critically dependent on initial leukocyte rolling. *Acta Physiol Scand* 146:415-421
152. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J (1994) Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature* 370:650-652
153. Lub M, van Kooyk Y, Figdor CG (1995) Ins and outs of LFA-1. *Immunol Today* 16:479-483
154. Lucas PJ, Negishi I, Nakayama K, Fields LE, Loh DY (1995) Naive CD28-deficient T cells can initiate but not sustain an in vitro antigen-specific immune response. *J Immunol* 154:5757-5768
155. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Davies SM, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, Wagner JE, Blazar BR (2002) Early antithymocyte globulin therapy

improves survival in patients with steroid-resistant acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:40-46

156. MacMillan ML, Weisdorf DJ, Wagner JE, DeFor TE, Burns LJ, Ramsay NK, Davies SM, Blazar BR (2002) Response of 443 patients to steroids as primary therapy for acute graft-versus-host disease: comparison of grading systems. *Biol Blood Marrow Transplant* 8:387-394
157. MacPherson GG, Jenkins CD, Stein MJ, Edwards C (1995) Endotoxin-mediated dendritic cell release from the intestine. Characterization of released dendritic cells and TNF- dependence. *J Immunol* 154:1317-1322
158. Maggard MA, Ke B, Wang T, Kaldas F, Seu P, Busuttil RW, Imagawa DK (1998) Effects of pravastatin on chronic rejection of rat cardiac allografts. *Transplantation*, 65:149-155
159. Maier S, Tertilt C, Chambron N, Gerauer K, Huser N, Heidecke CD, Pfeffer K (2001) Inhibition of natural killer cells results in acceptance of cardiac allografts in CD28^{-/-} mice. *Nat Med* 7:557-562
160. Malissen B (1999) Dancing the immunological two-step. *Science* 285:207-208
161. Maloy KJ, Odermatt B, Hengartner H, Zinkernagel RM (1998) Interferon gamma-producing gammadelta T cell-dependent antibody isotype switching in the absence of germinal center formation during virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1160-1165
162. Martin PJ, Nelson BJ, Appelbaum FR, Anasetti C, Deeg HJ, Hansen JA, McDonald GB, Nash RA, Sullivan KM, Witherspoon RP, Scannon PJ, Friedmann N, Storb R (1996) Evaluation of a CD5-specific immunotoxin for treatment of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 88:824-830
163. Martin PJ, Pei J, Gooley T, Anasetti C, Appelbaum FR, Deeg J, Hansen JA, Nash RA, Petersdorf EW, Storb R, Ghetie V, Schindler J, Vitetta ES (2004) Evaluation of a CD25-specific immunotoxin for prevention of graft-versus-host disease after unrelated marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 10:552-560

164. Mathe G, Pritchard LL, Halle-Pannenko O (1979) Mismatching for Minor Histocompatibility Antigens in Bone Marrow Transplantation: Consequences for the Development and Control of Severe Graft-Versus-Host Disease. *Transplant Proc* 11:235-239
165. McAlister VC, Gao Z, Peltekian K, Domingues J, Mahalati K, MacDonald AS (2000) Sirolimus-tacrolimus combination immunosuppression. *Lancet* 355:376-377
166. McCarey DW, McInnes IB, Sattar N (2001) The antiinflammatory effects of statins. *N Engl J Med* 345:1209-1210
167. McCarthy PL Jr, Abhyankar S, Neben S, Newman G, Sieff C, Thompson RC, Burakoff SJ, Ferrara JL (1991) Inhibition of interleukin-1 by an interleukin-1 receptor antagonist prevents graft-versus-host disease. *Blood* 78:1915-1918
168. McCarthy Jr PL, Williams L, Harris-Bacile M, Yen J, Przepiorka D, Ippoliti C, Champlin R, Fay J, Blosch C, Jacobs C, Ansetti C (1996) A Clinical Phase I/II Study of Recombinant Human Interleukin-1 Receptor in Glucocorticoid-Resistant Graft-versus-Host Disease. *Transplantation* 62:626-631
169. McSweeney P, Abhyankar S, Petersen F (2003) Tacrolimus and mycophenolate mofetil for GVHD prevention after unrelated donor transplants. *Blood* 102:717a
170. McSweeney P, Abhyankar S, Foran J (2003) Favorable early transplant outcomes using tacrolimus and mycophenolate mofetil for GVHD prevention after matched sibling allografting. *Blood* 102:717a
171. McWilliam AS, Nelson D, Thomas JA, Holt PG (1994) Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J Exp Med* 179:1331-1336
172. Meiser BM, Billingham ME, Morris RE (1991) Effects of cyclosporin, FK506, and rapamycin on graft-vessel disease. *Lancet* 338:1297-1298
173. Meijer E, Cornelissen JJ, Lowenberg B, Verdonck LF (2003) Antithymocyteglobulin as prophylaxis of graft failure and graft-versus-host

disease in recipients of partially T-cell-depleted grafts from matched unrelated donors: a dose-finding study. *Exp Hematol* 31:1026-1030

174. Miller KB, Roberts TF, Chan G, Schenkein DP, Lawrence D, Sprague K, Gorgun G, Relias V, Grodman H, Mahajan A, Foss FM (2004) A novel reduced intensity regimen for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation associated with a reduced incidence of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 33:881-889
175. Min CK, Maeda Y, Lowler K, Liu C, Clouthier S, Lofthus D, Weisiger E, Ferrara JL, Reddy P (2004) Paradoxical effects of interleukin-18 on the severity of acute graft-versus-host disease mediated by CD4+ and CD8+ T-cell subsets after experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 104:3393-3399
176. Mitsuyasu RT, Champlin RE, Gale RP, Ho WG, Lenarsky C, Winston D, Selch M, Elashoff R, Giorgi JV, Wells J, et al (1986) Treatment of donor bone marrow with monoclonal anti-T-cell antibody and complement for the prevention of graft-versus-host disease. A prospective, randomized, double-blind trial. *Ann Intern Med* 105:20-26
177. Miwa K, Hashimoto H, Yatomi T, Nakamura N, Nagata S, Suda T (1999) Therapeutic effect of an anti-Fas ligand mAb on lethal graft-versus-host disease. *Int Immunol* 11:925-931
178. Mohle R, Moore MA, Nachman RL, Rafii S (1997) Transendothelial migration of CD34+ and mature hematopoietic cells: an in vitro study using a human bone marrow endothelial cell line. *Blood* 89:72-80
179. Mondino A, Khoruts A, Jenkins MK (1996) The anatomy of T-cell activation and tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:2245-2252
180. Mori N, Horie Y, Gerritsen ME, Anderson DC, Granger DN (1999) Anti-inflammatory drugs and endothelial cell adhesion molecule expression in murine vascular beds. *Gut* 44:186-195
181. Morris RE, Meiser BM, Wu J, Shorthouse R, Wang J (1991) Use of rapamycin for the suppression of alloimmune reactions in vivo: schedule dependence, tolerance induction, synergy with cyclosporine and FK 506, and effect on host-versus-graft and graft-versus-host reactions. *Transplant Proc* 23:521-524

182. Moy VT, Brian AA (1992) Signaling by Lymphocyte Function-associated Antigen 1 (LFA-1) in B Cells: Enhanced Antigen Presentation after Stimulation through LFA-1. *J Exp Med* 175:1-7
183. Murphy J (1916) The effect of adult chicken organ graft on the chick embryo. *J Exp Med* 24:1-6
184. Murphy WJ, Welniak LA, Taub DD, Wiltout RH, Taylor PA, Vallera DA, Kopf M, Young H, Longo DL, Blazar BR (1998) Differential Effects of the Absence of Interferon- γ and IL-4 in Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Mice. *J Clin Invest* 102:1742-1748
185. Murphy WJ, Blazar BR (1999) New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol* 11:509-515
186. Murai M, Yoneyama H, Harada A, Yi Z, Vestergaard C, Guo B, Suzuki K, Asakura H, Matsushima K (1999) Active participation of CCR5(+)CD8(+) T lymphocytes in the pathogenesis of liver injury in graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 104:49-57
187. Nakakura EK, McCabe SM, Zheng B, Shorthouse RA, Scheiner TM, Blank G, Jardieu PM, Morris RE (1993) A non-lymphocyte-depleting monoclonal antibody to the adhesion molecule LFA-1 (CD11a) prevents sensitization to alloantigens and effectively prolongs the survival of heart allografts. *Transplant Proc* 25:809-812
188. Nakakura EK, Shorthouse RA, Zheng B, McCabe SM, Jardieu PM, Morris RE (1996) Long-term survival of solid organ allografts by brief anti-lymphocyte function-associated antigen-1 monoclonal antibody monotherapy. *Transplantation* 62:547-552
189. Nash RA, Antin JH, Karanes C, Fay JW, Avalos BR, Yeager AM, Przepiorka D, Davies S, Petersen FB, Bartels P, Buell D, Fitzsimmons W, Anasetti C, Storb R, Ratanatharathorn V (2000) Phase 3 study comparing methotrexate and tacrolimus with methotrexate and cyclosporine for prophylaxis of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation from unrelated donors. *Blood* 96:2062-2068
190. Nash R, Johnston L, Parker P (2003) a phase I/II study of mycophenolate mofetil (MMF) in combination with cyclosporine (CSP) for prophylaxis of

graft versus host disease (GVHD) after myeloablative conditioning and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HCT): dose escalation of MMF. *Blood* 102:240a

191. New JY, Li B, Koh WP, Ng HK, Tan SY, Yap EH, Chan SH, Hu HZ (2002) T cell infiltration and chemokine expression: relevance to the disease localization in murine graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 29:979-986
192. Ni HT, Deeths MJ, Li W, Mueller DL, Mescher MF (1999) Signaling pathways activated by leukocyte function-associated Ag-1- dependent costimulation. *J Immunol* 162:5183-5189
193. Ni HT, Deeths MJ, Mescher MF (2001) LFA-1-mediated costimulation of CD8+ T cell proliferation requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *J Immunol* 166:6523-6529
194. Nichols CR, Andersen J, Lazarus HM, Fisher H, Greer J, Stadtmauer EA, Loehrer PJ, Trump DL (1992) High-Dose Carboplatin and Etoposide With Autologous Bone Marrow Transplantation in Refractory Germ Cell Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Protocol. *J Clin Oncol* 10:558-563
195. Nishibori M, Takahashi HK, Mori S (2003) The regulation of ICAM-1 and LFA-1 interaction by autacoids and statins: a novel strategy for controlling inflammation and immune responses. *J Pharmacol Sci* 92:7-12
196. Nishizuka Y (1986) Studies and Perspectives of Protein Kinase C. *Science* 233:305-312
197. Ochs LA, Blazar BR, Roy J, Rest EB, Weisdorf DJ (1996) Cytokine expression in human cutaneous chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 17:1085-1092
198. O'Donnell MR, Nademanee AP, Synder DS, Schmidt GM, Parker PM, Biermann PJ, Fahey JL, Stein AS, Krance RA, Stock AD, Forman SJ, Blume KG (1987) Bone Marrow Transplantation for Myelodysplastic and Myeloproliferative Syndromes. *J Clin Oncol* 5:1822-1826
199. Ogawa S, Nagamatsu G, Watanabe M, Watanabe S, Hayashi T, Horita S, Nitta K, Nihei H, Tezuka K, Abe R (2001) Opposing effects of anti-

- activation-inducible lymphocyte-immunomodulatory molecule/inducible costimulator antibody on the development of acute versus chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* 167:5741-5748
200. O'Reilly RJ, Keever CA, Small TN, Rochstein J (1989) The Use of HLA-non-Identical T-Cell-Depleted Marrow Transplants for Correction of Severe Combined Immunodeficiency Disease. *Immunodef Rev* 1:273-309
 201. Panoskaltsis-Mortari A, Lacey DL, Vallera DA, Blazar BR (1998) Keratinocyte Growth Factor Administered Before Conditioning Ameliorates Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Mice. *Blood* 92:3960-3967
 202. Panoskaltsis-Mortari A, Hermanson JR, Haddad IY, Wangenstein OD, Blazar BR (2001) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1, CD54) deficiency segregates the unique pathophysiological requirements for generating idiopathic pneumonia syndrome (IPS) versus graft-versus-host disease following allogeneic murine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 7:368-377
 203. Panoskaltsis-Mortari A, Price A, Hermanson JR, Taras E, Lees C, Serody JS, Blazar BR (2004) In vivo imaging of graft-versus-host-disease in mice. *Blood* 103:3590-3598
 204. Papp K, Bissonnette R, Krueger JG, Carey W, Gratton D, Gulliver WP, Lui H, Lynde CW, Magee A, Minier D, Ouellet JP, Patel P, Shapiro J, Shear NH, Kramer S, Walicke P, Bauer R, Dedrick RL, Kim SS, White M, Garovoy MR (2001) The treatment of moderate to severe psoriasis with a new anti-CD11a monoclonal antibody. *J Am Acad Dermatol* 45:665-674
 205. Peled A, Kollet O, Ponomaryov T, Petit I, Franitza S, Grabovsky V, Slav MM, Nagler A, Lider O, Alon R, Zipori D, Lapidot T (2000) The chemokine SDF-1 activates the integrins LFA-1, VLA-4, and VLA-5 on immature human CD34(+) cells: role in transendothelial/stromal migration and engraftment of NOD/SCID mice. *Blood* 95:3289-3296
 206. Pendl GG, Robert C, Steinert M, Thanos R, Eytner R, Borges E, Wild MK, Lowe JB, Fuhlbrigge RC, Kupper TS, Vestweber D, Grabbe S (2002) Immature mouse dendritic cells enter inflamed tissue, a process that requires E- and P-selectin, but not P-selectin glycoprotein ligand 1. *Blood* 99:946-956

207. Perez-Simon JA, Kottaridis PD, Martino R, Craddock C, Caballero D, Chopra R, Garcia-Conde J, Milligan DW, Schey S, Urbano-Ispizua A, Parker A, Leon A, Yong K, Sureda A, Hunter A, Sierra J, Goldstone AH, Linch DC, San Miguel JF, Mackinnon S; Spanish and United Kingdom Collaborative Groups for Nonmyeloablative Transplantation (2002) Nonmyeloablative transplantation with or without alemtuzumab: comparison between 2 prospective studies in patients with lymphoproliferative disorders. *Blood* 100:3121-3127
208. Peters WP, Shpall EJ, Jones RB, Olsen GA, Bast RC, Gockerman JP, Moore JO (1988) High-Dose Combination Alkylating Agents With Bone Marrow Support as Initial Treatment for Metastatic Breast Cancer. *J Clin Oncol* 6:1368-1376
209. Philip T, Armitage JO, Spitzer G, Chauvin F, Jagannath S, Cahn J-Y, Colombat P, Goldstone AH, Corin NC, Flesh M, Laporte J-M, Maraninchi D, Pico J, Bosly A, Anderson C, Schots R, Biron P, Cabanillas F, Dicke K (1987) High-Dose Therapy and Autologous Bone Marrow Transplantation after Failure of Conventional Chemotherapy in Adults with Intermediate-Grade or High-Grade Non-Hodgkin's Lymphoma. *N Eng J Med* 316:1494-1498
210. Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T (1996) Salicylates inhibit I kappa B-alpha phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration. *J Immunol* 156:3961-3969
211. Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 275:21785-21788
212. Porcelli SA, Modlin RL (1999) The CD1 System: Antigen-presenting Molecules for Cell Recognition of Lipids and Glycolipids. *Annu Rev Immunol* 17:297-329
213. Poston RS, Robbins RC, Chan B, Simms P, Presta L, Jardieu P, Morris RE (2000) Effects of humanized monoclonal antibody to rhesus CD11a in rhesus monkey cardiac allograft recipients. *Transplantation* 69:2005-2013
214. Pribila JT, Quale AC, Mueller KL, Shimizu Y (2004) Integrins and T cell-mediated immunity. *Annu Rev Immunol* 22:157-180

215. Price AA, Cumberbatch M, Kimber I, Ager A (1997) Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med* 186:1725-1735
216. Przepiorka D, Phillips GL, Ratanatharathorn V, Cottler-Fox M, Sehn LH, Antin JH, Lebherz D, Awwad M, Hope J, McClain JB (1998) A Phase II Study of BTI-322, a Monoclonal Anti-CD2 Antibody, for Treatment of Steroid-Resistant Acute Graft-Versus-Host Disease. *Blood* 92:4066-4071
217. Przepiorka D, Smith TL, Folloder J, Khouri I, Ueno NT, Mehra R, Körbling M, Huh YO, Giralat S, Gajewski J, Donato M, Clearky K, Claxton D, Braunschweig I, Van Besien K, Andersson BS, Anderlini P, Camplin R (1999) Risk Factors for Acute Graft-Versus-Host Disease After Allogeneic Blood Stem Cell Transplantation. *Blood* 94:1465-1470
218. Przepiorka D, Kernan NA, Ippoliti C, Papadopoulos EB, Giralat S, Khouri I, Lu JG, Gajewski J, Durett A, Cleary K, Champlin R, Andersson BS, Light S (2000) Daclizumab, a humanized anti-interleukin-2 receptor alpha chain antibody, for treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood* 95:83-89
219. Rachamim N, Gan J, Segall H, Krauthgamer R, Marcus H, Berrebi A, Martelli M, Reisner Y (1998) Tolerance induction by "megadose" hematopoietic transplants: donor-type human CD34 stem cells induce potent specific reduction of host anti-donor cytotoxic T lymphocyte precursors in mixed lymphocyte culture. *Transplantation* 65:1386-1393
220. Ranscht B (1994) Cadherins and catenins: interactions and functions in embryonic development. *Curr Opin Cell Biol* 6:740-746
221. Ratanatharathorn V, Ayash L, Reynolds C, Silver S, Reddy P, Becker M, Ferrara JL, Uberti JP (2003) Treatment of chronic graft-versus-host disease with anti-CD20 chimeric monoclonal antibody. *Biol Blood Marrow Transplant* 9:505-511
222. Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K, Ferrara JL (2001) Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J Exp Med* 194:1433-1440
223. Reiffers J, Marit G, Boiron JM (1989) Autologous Blood Stem Cell Transplantation in High-Risk Multiple Myeloma. *Br J Haematol* 72:296-297

224. Remberger M, Storer B, Ringden O, Anasetti C (2002) Association between pretransplant Thymoglobulin and reduced non-relapse mortality rate after marrow transplantation from unrelated donors. *Bone Marrow Transplant* 29:391-397
225. Ringden O, Klaesson S, Sundberg B, Ljungman P, Lonnqvist B, Persson U (1992) Decreased incidence of graft-versus-host disease and improved survival with methotrexate combined with cyclosporin compared with monotherapy in recipients of bone marrow from donors other than HLA identical siblings. *Bone Marrow Transplant* 9:19-25
226. Ringden O (2005) Introduction to graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 11(2 Suppl 2):17-20
227. Roake JA, Rao AS, Morris PJ, Larsen CP, Hankins DF, Austyn JM (1995) Dendritic cell loss from nonlymphoid tissues after systemic administration of lipopolysaccharide, tumor necrosis factor, and interleukin 1. *J Exp Med* 181:2237-2247
228. Rosen SD, Bertozzi CR (1994) The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol* 6:663-673
229. Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF, Velardi A (1999) Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 94:333-339
230. Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295:2097-2100
231. Salama AD, Remuzzi G, Harmon WE, Sayegh MH (2001) Challenges to achieving clinical transplantation tolerance. *J Clin Invest* 108:943-948
232. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA (2004) Rolling adhesion through an extended conformation of integrin α L β 2 and relation to α I and β I-like domain interaction. *Immunity* 20:393-406

233. Sale GE (2005) Pathogenesis of graft-versus-host-disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 11(2 Suppl 2):21-23
234. Salomon B, Bluestone JA (1998) LFA-1 interaction with ICAM-1 and ICAM-2 regulates Th2 cytokine production. *J Immunol* 161:5138-5142
235. Sanchez-Madrid F, Krensky AM, Ware CF, Robbins E, Strominger JL, Burakoff SJ, Springer TA (1982) Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7489-7493
236. Sayegh MH, Turka LA (1998) The role of T-cell costimulatory activation pathways in transplant rejection. *N Engl J Med* 338:1813-1821
237. Schiltz PM, Giorno RC, Claman HN (1994) Increased ICAM-1 expression in the early stages of murine chronic graft-versus-host disease. *Clin Immunol Immunopathol* 71:136-141
238. Schlegel PG, Aharoni R, Chen Y, Chen J, Teitelbaum D, Arnnon R, Sela M, Chao NJ (1996) A synthetic random basic copolymer with promiscuous binding to class II major histocompatibility complex molecules inhibits T-Cell proliferative responses to major and minor histocompatibility antigens in vitro and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease in vivo. *Immunology* 93:5061-5066
239. Schmits R, Kündig TM, Baker DM, Shumaker G, Simard JJL, Duncan G, Wakeham A, Shahinian A, Van der Heiden A, Bachmann MF, Ohashi PS, Mak TW, Hickstein DD (1996) LFA-1-deficient Mice Show Normal CTL Responses to Virus but Fail to Reject Immunogenic Tumor. *J Exp Med* 183:1415-1426
240. Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, Wakeham A, Shahinian A, Catzavelos C, Rak J, Furlonger C, Zakarian A, Simard JJ, Ohashi PS, Paige CJ, Gutierrez-Ramos JC, Mak TW (1997) CD44 regulates hematopoietic progenitor distribution, granuloma formation, and tumorigenicity. *Blood* 90:2217-2233
241. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 393, 480-483, 1998

242. Schwartz RH (1992) Costimulation of T-Lymphocytes: The Role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in Interleukin-2 Production and Immunotherapy. *Cell* 71:1065-1068
243. Serody JS, Cook DN, Kirby SL, Reap E, Shea TC, Freilinger JA (1999) Murine T Lymphocytes Incapable of Producing Macrophage Inhibitory Protein-1 α Are Impaired in Causing Graft-Versus-Host Disease Across a Class I But Not Class II Major Histocompatibility Complex Barrier. *Blood* 93:43-50
244. Serody JS, Burkett SE, Panoskaltsis-Mortari A, Ng-Cashin J, McMahon E, Matsushima GK, Lira SA, Cook DN, Blazar BR (2000) T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood* 96:2973-2980
245. Seung E, Iwakoshi N, Woda BA, Markees TG, Mordes JP, Rossini AA, Greiner DL (2000) Allogeneic hematopoietic chimerism in mice treated with sublethal myeloablation and anti-CD154 antibody: absence of graft-versus-host disease, induction of skin allograft tolerance, and prevention of recurrent autoimmunity in islet-allografted NOD/Lt mice. *Blood* 95:2175-2182
246. Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, Kawai K, Ohashi PS, Thompson CB, Mak TW (1993) Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science* 261:609-612
247. Shamri R, Grabovsky V, Gauguier JM, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH, Alon R (2005) Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 6:497-506
248. Shier P, Ngo K, Fung-Leung WP (1999) Defective CD8+ T cell activation and cytolytic function in the absence of LFA-1 cannot be restored by increased TCR signaling. *J Immunol* 163:4826-4832
249. Shimaoka M, Takagi J, Springer TA (2002) Conformational regulation of integrin structure and function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31:485-516

250. Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O, Kinashi T (2003) Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J Cell Biol* 161:417-427
251. Shinde S, Wu Y, Guo Y, Niu Q, Xu J, Grewal IS, Flavell R, Liu Y (1996) CD40L is important for induction of, but not response to costimulatory activity. ICAM-1 as the second costimulatory molecule rapidly up-regulated by CD40L. *J Immunol* 157:2764-2768
252. Shiohara T, Moriya N, Gotoh C, Saizawa K, Nagashinan M (1988) Locally Administered Monoclonal Antibodies to Lymphocyte Function-Associated Antigen and to L3T4 Prevent Cutaneous Graft-vs-Host Disease. *J Immunol* 141:2261-2267
253. Shlomchik WD, Couzens MS, Tang CB, McNiff J, Robert ME, Liu J, Shlomchik MJ, Emerson SG (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415
254. Sims TN, Dustin ML (2002) The immunological synapse: integrins take the stage. *Immunol Rev* 186:100-117
255. Sirim P, Zeitlmann L, Kellersch B, Falk CS, Schendel DJ, Kolanus W (2001) Calcium signaling through the beta 2-cytoplasmic domain of LFA-1 requires intracellular elements of the T cell receptor complex. *J Biol Chem* 276:42945-42956
256. Sligh Jr JE, Ballantyne CM, Rich SS, Hawkins HK, Smith CW, Bradley A, Beaudet AL (1993) Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:8529-8533
257. Speiser DE, Bachmann MF, Shahinian A, Mak TW, Ohashi PS (1997) Acute graft-versus-host disease without costimulation via CD28. *Transplantation* 63:1042-1044
258. Spring FA, arsons SF, Ortlepp S, Olsson ML, Sessions R, Brady RL, Anstee DJ (2001) Intercellular adhesion molecule-4 binds alpha(4)beta(1) and alpha(V)- family integrins through novel integrin-binding mechanisms. *Blood* 98:458-466

259. Springer TA (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 346:425-434
260. Springer TA (1994) Traffic Signals for Lymphocyte Recirculation and Leukocyte Emigration: the Multistep Paradigm. *Cell* 76:301-314
261. Sriramarao P, von Andrian UH, Butcher EC, Bourdon MA, Broide DH (1994) L-selectin and very late antigen-4 integrin promote eosinophil rolling at physiological shear rates in vivo. *J Immunol* 153:4238-4246
262. Stanzani M, Martins SL, Saliba RM, St John LS, Bryan S, Couriel D, McMannis J, Champlin RE, Molldrem JJ, Komanduri KV (2004) CD25 expression on donor CD4+ or CD8+ T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood* 103:1140-1146
263. Starling GC, McLellan AD, Egner W, Sorg RV, Fawcett J, Simmons DL, Hart DN (1995) Intercellular adhesion molecule-3 is the predominant co-stimulatory ligand for leukocyte function antigen-1 on human blood dendritic cells. *Eur J Immunol* 25:2528-2532
264. Stoppa AM, Maraninchi D, Blaise D, Viens P, Hirn M, Olive D, Reiffers J, Milpied N, Gaspard MH, Mawas C (1991) Anti-LFA1 monoclonal antibody (25.3) for treatment of steroid-resistant grade III-IV acute graft-versus-host disease. *Transplant Int* 4:3-7
265. Sullivan KM, Shulman HM, Storb R, Weiden PL, Witherspoon RP, McDonald GB, Schubert MM, Atkinson K, Thomas ED (1981) Chronic Graft-Versus-Host Disease in 52 Patients: Adverse Natural Course and Successful Treatment With Combination Immunosuppression. *Blood* 57:267-276
266. Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA (1995) Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood* 86:2429-2438
267. Takazawa K, Hosoda Y, Bashuda H, Seino K, Yagita H, Tamatani T, Miyasaka M, Okumura K (1996) Synergistic effects of mycophenolate mofetil (MMF, RS-61443) and anti- LFA-1/ICAM-1 monoclonal antibodies on the prolongation of heart allograft survival in rats. *Transplant Proc* 28:1980-1981

268. Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR (2002) The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99:3493-3499
269. Thomas ED, Lochte HL, Lu WC, Ferrebee JW (1957) Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *New Eng J Med* 257:491-496
270. Thomas ED, Lochte HL Jr, Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW (1959) Supralethal Whole Body Irradiation and Isologous Marrow Transplantation in Man. *J Clin Invest* 1709-1716
271. Thomas ED, Collins JA, Emery CH Jr, Ferrebee JW (1962) Marrow Transplants in Lethally Irradiated Dogs Given Methotrexate. *Blood* 19:217-228
272. Thomas ED, Storb R (1970) Technique for Human Marrow Grafting. *Blood* 36:507-515
273. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD (1975) Bone-Marrow Transplantation. *New Eng J Med* 292:832-843 & 895-902
274. Thomas ED, Buckner CD, Banaji M, Clift RA, Fefer A, Flournoy N, Goodell BW, Hickman RO, Lerner KG, Neiman PE, Sale GE, Sanders JE, Singer J, Stevens M, Storb R, Weiden PL (1977) One Hundred Patients With Acute Leukemia Treated by Chemotherapy, Total Body Irradiation, and Allogeneic Marrow Transplantation. *Blood* 49:511-533
275. Thomas ED, Buckner CD, Sanders JE, Papayannopoulou T, Borgna-Pignatti C, De Stefano P, Sullivan KM, Clift RA, Storb R (1982) Marrow Transplantation for Thalassaemia. *Lancet* 2:227-229
276. Thomas ED, Clift RA, Fefer A, Appelbaum FR, Beatty P, Bensinger WI, Buckner CD, Cheever MA, Deeg HJ, Doney K, Flournoy N, Greenber P, Hansen JA, Martin P, McGuffin R, Ramberg R, Sanders JE, Singer J, Stewart P, Storb R, Sullivan K, Weiden PL, Witherspoon R (1986) Marrow Transplantation for the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. *Ann Intern Med* 104:155-163

277. Thorlacius H, Vollmar B, Guo Y, Mak TW, Pfreundschuh MM, Menger MD, Schmits R (2000) Lymphocyte function antigen 1 (LFA-1) mediates early tumour necrosis factor- α induced leukocyte adhesion in venules. *Br J Haematol* 110:424-429
278. Thurston G, Baluk P, McDonald DM (2000) Determinants of Endothelial Cell Phenotype in Venules. *Microcirculation* 7:67-80
279. Tian L, Kilgannon P, Yoshihara Y, Mori K, Gallatin WM, Carpen O, Gahmberg CG (2000) Binding of T lymphocytes to hippocampal neurons through ICAM-5 (telencephalin) and characterization of its interaction with the leukocyte integrin CD11a/CD18. *Eur J Immunol* 30:810-818
280. To LB, Shepperd KM, Haylock DN, Dyson PG, Charles P, Thorp DL, Dale BM, Dart GW, Roberts MM, Sage RE, Juttner CA (1990) Single High Doses of Cyclophosphamide Enable the Collection of High Numbers of Hemopoietic Stem Cells from the Peripheral Blood. *Exp Hematol* 18:442-447
281. Tominaga Y, Kita Y, Satoh A, Asai S, Kato K, Ishikawa K, Horiuchi T, Takashi T (1998) Affinity and kinetic analysis of the molecular interaction of ICAM-1 and leukocyte function-associated antigen-1. *J Immunol* 161:4016-4022
282. Uberti J, Ayash L, Levine J (2003) Phase I/II trial on the use of etanercept (Enbrel) and soluMedrol as primary treatment for acute graft-vs-host disease (aGVHD). *Blood* 102:243a
283. Urra JM, Arteta M, Gomez-Caturla A, Garcia-Duran F (2001) A chimeric anti-TNF α monoclonal antibody (cA2) in vivo removes TNF α -producing cells in Crohn's disease. *Hum Antibodies* 10:91-94
284. Van Kooyk Y, Van de Wiele, Van Kemenade, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG (1989) Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 342:811-813
285. Van Kooyk Y, Figdor CG (2000) Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr Opin Cell Biol*, 12:542-547
286. Van Oosterhout YV, van Emst L, Schattenberg AV, Tax WJ, Ruiter DJ, Spits H, Nagengast FM, Masereeuw R, Evers S, de Witte T, Preijers FW

- (2003) A combination of anti-CD3 and anti-CD7 ricin A-immunotoxins for the in vivo treatment of acute graft versus host disease. *Blood* 95:3693-3701
287. Van Seventer GA, Shimizu Y, Horgan KJ, Shaw S (1990) The LFA-1 Ligand ICAM-1 Provides an Important Costimulatory Signal for T-Cell Receptor-Mediated Activation of Resting T Cells. *J Immunol* 144:4579-4586
 288. Van Seventer GA, Newman W, Shimizu Y, Nutman TB, Tanaka Y, Horgan KJ, Gopal TV, Ennis E, O'Sullivan D, Grey H (1991) Analysis of T cell stimulation by superantigen plus major histocompatibility complex class II molecules or by CD3 monoclonal antibody: costimulation by purified adhesion ligands VCAM-1, ICAM-1, but not ELAM-1. *J Exp Med* 174:901-913
 289. Van Seventer GA, Bonvini E, Yamada H, Conti A, Stringfellow S, June CH, Shaw S (1992) Costimulation of T cell receptor/CD3-mediated activation of resting human CD4+ T cells by leukocyte function-associated antigen-1 ligand intercellular cell adhesion molecule-1 involves prolonged inositol phospholipid hydrolysis and sustained increase of Intracellular Ca²⁺ levels. *J Immunol* 149:3872-3880
 290. Vermynen C, Robles EF, Ninane J, Cornu G (1988) Bone Marrow Transplantation in Five Children with Sick Cell Anaemia. *Lancet* 1:1427-1428
 291. Via CS, Nguyen P, Shustov A, Drappa J, Elkon KB (1996) A major role for the Fas pathway in acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 157:5387-5393
 292. Von Adrian UH, Chambers JD, McEvoy LM, Bargatze RF, Arfors KE, Butcher EC (1991) Two-step Model of Leukocyte-endothelial Cell Interaction In Inflammation: distinct Roles for LECAM-1 and the Leukocyte β 2 Integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7538-7542
 293. Von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, Berger EM, Torres F, Butcher EC, Arfors KE (1992) L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol* 263:H1034-H1044

294. Von Herrath MG, Yokoyama M, Dockter J, Oldstone MB, Whitton JL (1996) CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. *J Virol* 70:1072-1079
295. Wagner JL, Flowers ME, Longton G, Storb R, Schubert M, Sullivan KM. (1998) The development of chronic graft-versus-host disease: an analysis of screening studies and the impact of corticosteroid use at 100 days after transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 22:139-146
296. Wagner N, Lohler J, Kunkel EJ, Ley K, Leung E, Krissansen G, Rajewsky K, Muller W (1996) Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* 382:366-370
297. Wagner UG, Koetz K, Weyand DM, Goronzy JJ (1998) Perturbation of the T Cell Repertoire in Rheumatoid Arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14447-14452
298. Wang MG, Szebeni J, Pearson DA, Szot GL, Sykes M (1995) Inhibition of graft-versus-host disease by interleukin-2 treatment is associated with altered cytokine production by expanded graft-versus-host-reactive CD4+ helper cells. *Transplantation* 60:481-490
299. Warnock RA, Askari S, Butcher EC, von Andrian UH (1998) Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *J Exp Med* 187:205-216
300. Watson CJ, Friend PJ, Jamieson NV, Frick TW, Alexander G, Gimson AE, Calne R (1999) Sirolimus: a potent new immunosuppressant for liver transplantation. *Transplantation* 67:505-509
301. Weiden PL, Sullivan KM, Flournoy N, Storb R, Thomas ED (1981) Antileukemic effect of chronic graft-versus-host disease: contribution to improved survival after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med* 304:1529-1533
302. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, Koup RA, Betts MR, Collins RH, Douek DC (2001) Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 97:1458-66

303. Weiss A, Imboden JB (1987) Cell Surface Molecules and Early Events Involved in Human T Lymphocyte Activation. *Adv Immunol* 41:1-38
304. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, Cottens S, Takada Y, Hommel U (2001) Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 7:687-692
305. Wenke K, Meiser B, Thiery J, Nagel D, von Scheidt W, Steinbeck G, Seidel D, Reichart B (1997) Simvastatin reduces graft vessel disease and mortality after heart transplantation: a four-year randomized trial. *Circulation* 96:1398-1402
306. Werther WA, Gonzalez TN, O'Connor SJ, McCabe S, Chan B, Hotaling T, Champe M, Fox JA, Jardieu PM, Berman PW, Presta LG (1996) Humanization of an anti-lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1 monoclonal antibody and reengineering of the humanized antibody for binding to rhesus LFA-1. *J Immunol* 157:4986-4995
307. Willenbacher W, Basara N, Blau IW, Fauser AA, Kiehl MG (2001) Treatment of steroid refractory acute and chronic graft-versus-host disease with daclizumab. *Br J Haematol* 112:820-823
308. Wingard JR, Piantadosi S, Vogelsang GB, Farmer ER, Jabs DA, Levin LS, Beschorner WE, Cahill RA, Miller DF, Harrison D, Saral R, Santos GW (1989) Predictors of Death From Chronic Graft-Versus-Host Disease After Bone Marrow Transplantation. *Blood* 74:1428-1435
309. Wysocki CA, Panoskaltsis-Mortari A, Blazar BR, Serody JS (2005) Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood* 105:4191-4199
310. Wood KJ, Sakaguchi S (2003) Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3:199-210
311. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW (1999) T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature* 402:827-832

312. Yu XZ, Martin PJ, Anasetti C (1998) Role of CD28 in acute graft-versus-host disease. *Blood* 92:2963-2970

7. Publikationen/Dank

Die Daten dieser Arbeit wurden 1999 auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie und der Jahrestagung der American Society of Hematologists als Poster vorgestellt.

„Lack of CD28 and LFA-1 is more efficient in Graft-versus-Host Disease (GvHD) Reduction than CD28 Deficiency alone“. R. Liersch, C. Thilmany, M. Pfreundschuh and R. Schmits. Innere Medizin I, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar. Onkologie, Vol 22, Suppl 1, August 1999, Seite 195.

„Role of LFA-1 in Graft-versus-Host Disease“. C. Thilmany, R. Liersch, M. Pfreundschuh and R. Schmits. Innere Medizin I, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar, Onkologie, Vol 22, Suppl 1, August 1999, Seite 201.

„Inhibition of Graft-versus-Host Disease (GvHD) is more effective after Transplantation of Donor Cells Lacking CD28 and LFA-1 compared to Leukocytes lacking CD28 only“. Ruediger Liersch, Claude Thilmany, Michael Pfreundschuh, Lorenz Truemper, Tak Mak, Rudolf Schmits. Internal Medicine, University of Saarland, Germany; Biophysics, Ontario cancer institute, Toronto, ON, Canada. Blood, Vol 94, No 10, Suppl 1 (Part 1 of 2), November 15, 1999, Page 552a.

Ich danke Herrn Priv. Doz. Dr. R. Schmits für seine langjährige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Ich danke zudem Herrn Prof. Dr. M. Pfreundschuh, der es mir ermöglichte, in seiner Abteilung zu promovieren.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des onkologischen Labors, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Insbesondere danke ich meinen Mit-Doktoranden Rüdiger Liersch und Ana Mateescu für ihre Kollegialität.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. M. Menger, Frau Prof. Dr. B. Vollmar und allen Mitarbeitern des Instituts für Klinisch Experimentelle Chirurgie für ihre Hilfe und Kooperation.

Ich danke den Mitarbeitern der Abteilung für Nuklearmedizin, in deren Räumlichkeiten die Konditionierung der Empfängermäuse stattfand.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern für ihre in jeder Hinsicht großzügige Unterstützung während des Studiums und bei der Ausführung dieser Arbeit bedanken.

8. Lebenslauf

Name	Claude THILMANY
Geburtsdatum	21 Mai 1975
Geburtsort	Luxemburg, Luxemburg
Vater	Georges THILMANY Diplom Ingenieur RWTH, Konrektor im Lycée technique des Arts et Métiers, Luxemburg
Mutter	Nicole BECKER, verheiratete THILMANY Sonderschullehrerin in Howald, Luxemburg
Familienstand	ledig

1981	-	1987	Ecole primaire de Howald, Howald/Luxemburg
1987	-	1994	Athénée de Luxembourg, Luxemburg
Juni	1993		University of Cambridge First Certificate in English
Dezember	1993		University of Cambridge Certificate of Proficiency in English
Juli	1994		Diplôme de Fin d'Etudes Secondaires (Abitur)
1994	-	1995	Studium der Medizin am Centre Universitaire de Luxembourg, Luxemburg
September	1995		Certificat d'Etudes Scientifiques
Oktober	1995		Fortführung des Studiums der Medizin an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
August	1996		Ärztliche Vorprüfung
August	1997		Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
August	1999		Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober	2000		Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	-	2002	Arzt im Praktikum am Dr. Von Haunerschen Kinderspital, München
Juli	2002		Approbation
Seit Juli	2002		Assistenzarzt am Dr. Von Haunerschen Kinderspital, München